UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1944-1945 — N° 326

RECHERCHES
SUR LE
FRACTIONNEMENT
DES PROTÉIDES SÉRIQUES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le lundi 18 Décembre 1944

PAR

Micheline MARTIN

PHARMACIEN

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

BOURSIÈRE DE RECHERCHES AU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Née à Baigneaux (Gironde), le 17 Novembre 1919

Examinateurs de la Thèse :

MM. CHELLE, professeur..... *Président*

CREYX, professeur.....

DE GRAILLY, professeur ..... *Juges*

MANDOUL, agrégé.....

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

—

1944

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536514_0019

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1944-1945 — N° 326

RECHERCHES
SUR LE
FRACTIONNEMENT
DES PROTÉIDES SÉRIQUES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le lundi 18 Décembre 1944

PAR

Micheline MARTIN

PHARMACIEN

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

BOURSIÈRE DE RECHERCHES AU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Née à Baigneaux (Gironde), le 17 Novembre 1919

Examinateurs de la Thèse :

MM. CHELLE, professeur..... *Président*

CREYX, professeur.....
DE GRAILLY, professeur ..... *Juges*
MANDOUL, agrégé.....

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

—

1944

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. N... — ASSESSEUR : M. LABAT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, BEILLE, DUPOUY, A. MANDOUL,
PETGES, GUYOT, ABADIE, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	N... / DUPÉRIÉ
Clinique chirurgicale et gynécologique	JEANNENEY
Clinique chirurgicale	PAPIN
Pathologie et thérapeutique générales	N...
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	VILLEMIN
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL
Hygiène	LEURET
Médecine légale et déontologie	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	RÉCHOU
Chimie	CHELLE
Botanique et matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Médecine expérimentale	N...
Physiologie	FABRE
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT
Clinique des maladies infectieuses	DAMADE
Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF
Physique médicale et pharmaceutique	N...
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	N...
Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	CREYX
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ

MM. PERY (Obstétrique), PERRENS (Maladies mentales),
CHARRIER (Chirurgie générale), FAUGÈRE (Obstétrique).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Anatomie	DUFOUR
Physiologie	FRANCK
Médecine générale	PIECHAUD / N... / N... / FONTAN / BROUSTET / N... / SARIC / DUBARRY
Chirurgie générale	N... / MASSÉ

	MM
Chirurgie générale	N... / MAGENDIE / POUYANNE
Obstétrique	N... / MAHON
Ophtalmologie	N...
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	N...
Physique médicale	N...
Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.	CASTAGNOU
Histoire naturelle pharmaceutique	GIRARD
Pharmacie	MESNARD / GRANGER
Histoire naturelle médicale et parasitologie.	R. MANDOUL

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	MASSÉ
Accouchements	MAHON
Puériculture	FAUGÈRE
Zoologie et parasitologie	R. MANDOUL
Médecine légale	N...
Urologie	N...
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI
Ophtalmologie	N...

	MM.
Anatomie	J. BEAUVIEUX
Chimie minérale	CASTAGNOU
Botanique	GIRARD
Cryptogamie	GIRARD
Pharmacie galénique	MESNARD
Bactériologie	MOUREAU
Physiologie	Mlle ROUGIER
Chimie biologique	TAYEAU
Parasitologie et biologie appliquées	PAUTRIZEL

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MA MÈRE

A MON PÈRE

A MON FIANCÉ

A MA SŒUR

A MON BEAU-FRÈRE

A MON NEVEU

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

A MON MAITRE DE STAGE

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

AU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Hommage de reconnaissance.

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE DOCTEUR TAYEAU

CHARGÉ DE COURS DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

CHARGÉ DE RECHERCHES AU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a constamment guidée dans nos recherches.
Témoignage de profonde gratitude.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ MANDOUL

CHEF DE LABORATOIRE A L'INSTITUT PASTEUR

Témoignage de reconnaissance pour le bienveillant intérêt qu'il nous a manifesté.

MONSIEUR LE PROFESSEUR DE GRAILLY

PROFESSEUR D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE
ET MICROSCOPIE CLINIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MÉDECIN DES HÔPITAUX

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Que nous remercions d'avoir bien voulu siéger à notre jury de thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CREYX

PROFESSEUR D'HYDROLOGIE THÉRAPEUTIQUE ET CLIMATOLOGIE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MÉDECIN DES HÔPITAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Avec nos sentiments respectueux et nos remerciements pour l'aimable accueil qu'il nous a toujours réservé.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHELLE

PROFESSEUR DE CHIMIE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Hommage de respectueuse reconnaissance pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de cette thèse.

AVANT-PROPOS

Avant d'aborder l'exposé de notre travail, il nous est particulièrement agréable de remercier ici M. le Docteur F. Tayeau.

Son enseignement si vivant nous révéla tout l'intérêt de la biochimie et le vaste champ d'études qu'elle ouvre aux chercheurs.

C'est avec une infinie bienveillance que M. le Docteur F. Tayeau nous a accueillie quand nous lui avons demandé de travailler avec lui. Pour apprendre le travail de laboratoire et de recherche, nous n'avons eu qu'à suivre son exemple et à écouter les conseils qu'il nous a prodigués.

Après nous avoir inspiré le sujet de cette thèse, M. le Docteur Tayeau a suivi notre travail pas à pas, sans nous ménager son aide précieuse et ses bienveillants encouragements. Nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude et notre sincère reconnaissance.

Au moment de quitter la Faculté, nous voulons dire encore que nous n'oublierons jamais l'atmosphère de travail dans l'enthousiasme qui règne au laboratoire de Chimie biologique parmi les élèves qui font des recherches sous la direction de M. le Docteur Tayeau.

RECHERCHES
SUR LE
FRACTIONNEMENT
DES PROTÉIDES SÉRIQUES

INTRODUCTION

La plupart des ouvrages de biochimie générale consacrent une large part au problème des protéides.

Les remarquables recherches de J. B. Dumas, Schuzenberger, Fischer, et plus tard de Lœb, Sœrensen, Svedberg, Tiselius, etc., ont constitué les pierres fondamentales de l'édifice que représentent aujourd'hui nos connaissances sur cette si importante question.

Peu à peu, le problème des protéides a traversé les domaines de la chimie analytique, de la chimie organique et de la chimie physique. Plus tard, il s'est cantonné principalement dans le cadre de la chimie biologique et de la physiologie.

A la suite des recherches qui ont démontré la présence d'une abondante quantité de protéides dans le sérum sanguin, la question des protéides s'est intégrée dans le domaine de la biologie médicale.

La teneur en protéides du sérum sanguin (*) subit d'importantes modifications au cours de certaines maladies (cirrhose atrophique de Laennec, néphrose lipoïdique,

(*) On emploie généralement pour la désigner en clinique le terme de protidémie, celui de protéidémie serait plus précis.

myélome, œdèmes par restriction, etc.), mais ces modifications apparaissent avec beaucoup plus de netteté si, au lieu d'envisager les protéides totaux, on considère les deux grandes variétés de protéides sériques, les globulines et les albumines.

Le problème du fractionnement des protéides sériques a présenté dès lors un grand intérêt clinique. Mais cet intérêt a grandi encore lorsque l'on a pu démontrer que dans les immunsérums les anticorps se trouvaient réunis dans certaines fractions protéidiques bien déterminées.

Les méthodes proposées pour la séparation des diverses fractions protéidiques dans le sérum sanguin abondent.

Malheureusement, elles donnent des résultats très variés; de plus, il arrive fréquemment qu'un même terme désigne des fractions protéidiques très différentes.

Depuis quelques années, il semble qu'une entente se soit réalisée entre les biochimistes et les cliniciens; la technique qui utilise le sulfate d'ammonium dans la précipitation des protéides sériques (Hofmeister) prévaut sur les autres.

Mais les protéides obtenus par cette méthode sont-ils homogènes et correspondent-ils réellement à des fractions bien définies ?

C'est la question que s'est posée notre maître, M. le Docteur Tayeau, qui a bien voulu nous associer aux travaux que, depuis quelques années, il a entrepris dans ce domaine. Les résultats que nous avons obtenus au cours de nos recherches font l'objet de la présente thèse.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

Rappel des notions élémentaires sur les protéides

Parmi les constituants de la matière vivante, les protéides restent à la fois les plus caractéristiques et les plus mal connus. Il est vrai que la complexité de leur constitution, les multiples fonctions dont se trouve hérissée leur molécule, leur comportement vis-à-vis des solvants leur confèrent des propriétés très particulières qui n'ont pu être expliquées qu'à la suite de patientes et difficiles recherches.

Pendant très longtemps, les protéides furent considérés comme des substances ayant un rôle purement statique (théorie colloïdale de Liebig). Cette conception est aujourd'hui complètement abandonnée à la suite des remarquables recherches de Hardy, Lœb, Michaelis et Sœrensen, et il semble que les propriétés des protéides doivent s'expliquer par les théories classiques de la chimie générale.

Etant donnée l'importance que nous accorderons dans notre travail aux propriétés physico-chimiques et à la constitution des protéides, nous ne croyons pas superflu de rappeler brièvement quelques notions élémentaires sur cet important groupe de substances.

On appelle protéides les principes immédiats qui, par hydrolyse, donnent des aminoacides et dont la complexité est supérieure à celle des polypeptides. On les subdivise :

1° En *holoprotéides* ou *protéines* qui, par hydrolyse, ne donnent que des aminoacides et de petites quantités d'ammoniaque;

2° En *hétéroprotéides,* dont l'hydrolyse fournit non seulement des aminoacides, mais encore d'autres substances non protidiques [148].

Seul, le premier groupe, qui constitue la presque totalité des protéides sériques, retiendra notre attention.

A part quelques exceptions (scléroprotéides), les protéines peuvent être obtenues en solution aqueuse; toutes cependant ne se dissolvent pas dans l'eau pure, certaines ne sont solubles dans l'eau qu'en présence de sels neutres, d'autres seulement en milieu légèrement alcalin ou acide.

Certains protéides ont pu être obtenus à l'état cristallisé, telles les albumines du sérum sanguin [59, 77, 177, 56, 83, 58, 118, 86], d'autres, par contre, n'ont pu être isolés qu'à l'état de précipité amorphe, c'est le cas des globulines du sérum sanguin par exemple.

Les protéides en solution ne diffusent que très lentement et l'on est parvenu à préparer des membranes à pores extrêmement fins qui laissent passer les molécules d'eau et des sels minéraux, mais qui ne laissent pas passer les protéides (dialyse, ultrafiltration) [105]. Ceci s'explique à la lumière de remarquables recherches qui ont montré que les protéides étaient constitués par de grosses molécules.

I. — Poids moléculaire des protéides

Le poids moléculaire des protéides peut être déterminé à l'aide de techniques chimiques et de méthodes physiques.

a) *Méthodes chimiques.* — Elles consistent à déterminer le taux d'un élément ou d'un acide aminé dont la teneur

est minimum dans le protéide considéré et à écrire que celui-ci contient au moins un atome de l'élément ou une molécule de l'acide aminé. Le nombre déterminé n'est qu'une limite inférieure du poids moléculaire et ne peut servir que de regroupement aux chiffres obtenus par d'autres méthodes [40].

Grâce à cette technique, Cohn, en 1925, publia un tableau résumant les connaissances acquises jusqu'alors et indiquant pour un grand nombre de protéides le poids moléculaire minimum [50]. Cette étude fut reprise par la suite par des méthodes physiques.

b) *Méthodes physiques.* — Ces techniques sont basées sur des propriétés telles que la pression osmotique, la tension superficielle, la vitesse et l'équilibre de sédimentation ou la vitesse de diffusion à travers une paroi poreuse. Si l'on examine les résultats obtenus par Svedberg à l'aide de l'ultracentrifugation, on s'aperçoit que le poids moléculaire correspond toujours approximativement à un multiple de 17.600. Aussi admet-on aujourd'hui que les unités élémentaires de poids moléculaire 17.600, dont les molécules de protéines paraissent constituées, sont des polypeptides ou des groupes de polypeptides. On admet actuellement de façon très générale que les protéides sont des hauts polymères, c'est-à-dire des substances complexes, résultant de la réunion par polymérisation d'unités moins complexes (*).

II. — Pouvoir amphotère des protéides

Le caractère amphotère, propriété fondamentale des molécules protéidiques, confère à ces substances des propriétés très spéciales. En milieu fortement acide, les protéides se comportent comme des bases faibles et sont

(*) Cité d'après Florkin [51].

ainsi ionisés positivement; en milieu fortement alcalin, ils réagissent comme des acides faibles et se trouvent ionisés négativement. Pour un certain pH, que l'on appelle *point isoélectrique,* le protéide possède autant de charges positives que de charges négatives; mais empressons-nous de noter que ce point dépend de la teneur en sels neutres de la solution; ces derniers peuvent en effet influer sur la charge électrique du protéide [170].

Le pH isolélectrique varie avec les protéides et constitue pour ces diverses substances une excellente caractéristique.

A côté du point isoélectrique, il convient de faire une place toute particulière au point isoionique, pH pour lequel le protéide libère autant d'ions H+ que d'ions (OH)—. Si les substances dissoutes à côté de la protéine n'avaient aucune influence sur sa charge, il y aurait identité entre le point isoionique et le point isoélectrique.

Nous aurons l'occasion par la suite de revenir longuement sur cette question (voir p. 31).

La majeure partie des propriétés physico-chimiques des protéides sont influencées par le pH. Ces propriétés sont maxima ou minima au pH isoélectrique (viscosité, tension superficielle, pression osmotique, coagulation par la chaleur).

Ces faits peuvent s'expliquer depuis les récentes conceptions sur la constitution des protéides.

III. — Constitution des protéides

Un grand nombre de recherches ont été effectuées sur la constitution des protéides et l'on admet aujourd'hui qu'une molécule protéidique comporte un certain nombre de constituants élémentaires (Sœrensen). Chacun de ces constituants serait une longue chaîne polypeptidique d'aminoacides unis les uns aux autres par des fonctions amides. A une extrémité de la chaîne se trouverait une fonction amine libre, tandis qu'à l'autre extrémité il y

aurait une fonction acide. Autour de la chaîne ainsi formée se trouveraient diverses fonctions provenant de restes des aminoacides constituant la chaîne.

Cette chaîne serait susceptible d'avoir les formes les plus variées; dans certains cas, elle formerait des cycles dicétopipéraziniques (Abder-Halden, Bergmann et Niemann); dans d'autres cas, on aurait des « zig-zag » (Astbury); on pourrait encore avoir affaire à des cyclols (Wrinch).

Quelle qu'en soit la forme, ces chaînes élémentaires formeraient des ensembles très complexes permettant d'expliquer le caractère « colloïdal » des protéides, et sur ces ensembles se trouveraient hérissées de multiples fonctions permettant de comprendre les nombreuses réactions chimiques et physiques du protéide (*).

(*) Dans une conférence de Boulanger [21], on trouvera une documentation pleine d'intérêt sur la constitution des protéides.

CHAPITRE II

Les protéides du sérum sanguin. Exposé des diverses techniques de séparation

Le sérum sanguin d'un homme adulte normal contient 75 à 85 g. de protéides par litre. Depuis bien longtemps, on a cherché à fractionner ces protéides et, dès 1851, Panum [133] a proposé la séparation des protéides sériques en deux grands groupes :

1° Le « Sérum-caséine » [133] qui précipite par dilution du sérum (*) ;

2° L' « Albumine » qui, dans ces conditions, reste dissoute.

Ces deux fractions ont été particulièrement bien étudiées par Hoppe Seyler [78], Schmidt [172], Lehmann [94], Kuhne [89], Pick [139], Hammarsten [63] et Eichwald [48]. Ces auteurs ont d'ailleurs proposé de remplacer le terme « sérum-caséine » par diverses dénominations (substances fibrinoplastiques, globulines, paraglobulines, alcali-albumines).

Plus tard, Schmidt [172], Weyl [206] et Kuhne [89] proposèrent de remplacer l'eau pure dans la dilution du sérum par de l'eau saturée en anhydride carbonique. Ils préconisèrent en outre la précipitation de l'albumine à partir de sa solution à l'aide d'acide acétique.

A la suite des recherches de tous ces auteurs, la technique

(*) Le terme de sérum-caséine a probablement été choisi à la suite des recherches de Guillot et Leblanc [60] et de Moleschott [125] qui s'étaient efforcés de démontrer la présence de caséine dans le sang, en se basant simplement sur le fait que le sérum sanguin coagulé par la chaleur et filtré donnait un précipité avec l'acide acétique.

suivante fut proposée pour l'extraction des protéides sériques : dans le sérum, étendu de dix fois son volume d'eau, on fait passer un courant d'anhydride carbonique. La sérum-globuline précipite. On filtre et on lave le précipité à l'aide d'eau saturée en anhydride carbonique (*). Le filtrat, contenant l'albumine, est additionné d'acide acétique qui provoque la précipitation des protéides que l'on peut recueillir aisément par filtration.

Parallèlement à ces recherches, l'école française s'attaquait à l'étude du sérum sanguin et, après Claude Bernard [16], Denis [42], en 1859, proposait la séparation des protéides sériques à l'aide de sels minéraux et en particulier le *sulfate de magnésium*. Denis isolait ainsi la « fibrine dissoute », qui semble voisine des globulines et qui est extraite en saturant le sérum de sulfate de magnésium, et la « sérine » correspondant à l'albumine soluble dans ces conditions et obtenue en ajoutant au liquide filtré du sulfate de sodium.

Les deux fractions ainsi obtenues à l'aide du sulfate de magnésium ont été soigneusement étudiées par Burkhardt [31]. Cet auteur a montré que le sulfate de magnésium précipite en même temps que la sérum-globuline une petite quantité d'une substance qu'il considère comme une albumine et qui, selon lui, se comporte comme la sérum-albumine, avec cette seule différence qu'elle est précipitable par le sulfate de magnésium. Burkhardt appuie sa conclusion sur le fait que si le précipité formé par le sulfate de magnésium est dissous dans l'eau et soumis à la dialyse, on n'obtient jamais la précipitation complète de la masse dissoute. Mais Hammarsten [62], qui a repris en détail toutes ces recherches, a clairement montré que la précipitation de la sérum-globuline par la dialyse n'est jamais absolument complète. De plus, la fraction restée dissoute

(*) On peut encore obtenir « la globuline » en portant à la dialyse contre de l'eau distillée le sérum sanguin.

et considérée par Burkhardt comme une albumine, possède en réalité tous les caractères de la sérum-globuline, et Hammarsten conclut que la dialyse est un procédé insuffisant pour obtenir la précipitation totale de la sérum-globuline (*). Il préconise ainsi que Starke [181] l'utilisation du sulfate de magnésium, encore employé aujourd'hui par divers auteurs [199].

Le *sulfate de sodium* eut aussi ses partisans (Homer [76] et Pinkus [144]). Howe [80] a particulièrement bien étudié le fractionnement des protéides sériques à l'aide du sulfate de sodium. Sa technique a été récemment perfectionnée par Lefrou et Bonnet [93]. Elle consiste à ajouter à un volume déterminé de sérum, trente volumes de solution de sulfate de sodium anhydre à 222 g. par litre, puis à porter le mélange à l'étuve à 37° pendant trois heures pour éviter la cristallisation du sel. Dans ces conditions, la sérum-globuline précipite tandis que l'albumine reste en solution. Cette dernière peut être précipitée à son tour par addition au liquide de formol et d'acide acétique. Certains auteurs (Campbell et Hanna [33], Kingsley [87]) ont plus ou moins modifié cette technique qui permet d'opérer sur de très faibles quantités de sérum [40].

Si le sulfate de magnésium et le sulfate de sodium restent encore utilisés aujourd'hui, aucun de ces sels cependant ne semble présenter les multiples avantages du *sulfate d'ammonium* dont l'utilisation avait été proposée depuis bien longtemps déjà par Michailow [123], Kauder [83] et Pohl [146]. Mais c'est surtout à la suite des belles recherches d'Hofmeister [72, 73, 74] que put être repris en détail le fractionnement des protéides du sérum.

(*) Les travaux de Marcus Emil [120] ayant permis le fractionnement des globulines en « euglobulines » et « pseudoglobulines » — ce dont il sera fait mention plus loin (voir p. 24) — nous permettent aujourd'hui de bien comprendre les recherches effectuées par Burkhardt et par Hammarsten.

Cet auteur remarque en effet que si l'on ajoute peu à peu du sulfate d'ammonium à du sérum, il se forme un précipité qui augmente avec la concentration en sel. Cependant, lorsque cette concentration atteint la demi-saturation, le précipité ne varie plus et, comme l'avait déjà remarqué Kauder [83], il faut élever nettement la concentration en sulfate d'ammonium pour observer la précipitation d'une nouvelle fraction. Hofmeister étudie les deux fractions : l'une insoluble dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation et l'autre soluble dans les mêmes conditions, et il remarque qu'elles sont très différentes par leur composition et par leurs propriétés. A la première de ces fractions il donne le nom de « globulines », à la seconde le nom d' « albumines ».

Cette méthode a provoqué de nombreuses critiques [176] et, dans les pages qui vont suivre, nous aurons l'occasion de revenir longuement sur ce sujet. Mais empressons-nous de noter dès maintenant que, faute de mieux, le procédé de fractionnement des protéides sériques par le sulfate d'ammonium reste aujourd'hui encore le plus utilisé [174].

La précipitation et le fractionnement des protéides par les sels minéraux ayant été l'objet de multiples critiques, on chercha tout naturellement à essayer l'action sur le sérum de substances variées et, en 1921, Piettre et Vila [143] montraient que l'*acétone*, utilisée dans certaines conditions, pouvait permettre le fractionnement des protéides sériques. En effet, si à un volume de sérum préalablement neutralisé par l'acide chlorhydrique, on ajoute 2,5 volumes d'acétone, il se forme un précipité que l'on peut recueillir par filtration et laver à l'acétone. Ce précipité, repris par l'eau, laisse insolubles les globulines, tandis que les albumines se dissolvent. Quelques modifications d'ordre pratique ont été apportées par la suite à la technique originale [140, 153], laquelle a fait l'objet de multiples et très intéressantes recherches de Boutaric, Roy, Achard, etc. [4, 3, 5, 23, 22, 41, 24, 25, 26, 6, 141, 142, 7].

Signalons enfin que bien d'autres substances ont été préconisées pour la séparation des protéides du sérum sanguin. Parmi ces substances, faisons une mention toute particulière au *citrate de potassium,* étudié en détail par Jameson et Roberts [81]. Ces auteurs ont appliqué la règle des phases aux protéides sériques.

A du sérum frais maintenu à 0° et à pH 6,8, on ajoute des quantités croissantes de citrate de potassium. Après séparation des précipités formés, on détermine la concentration en protéides et en citrate de la phase liquide. Les résultats obtenus se trouvent réunis dans un diagramme représentatif d'équilibres chimiques selon Gibbs, en l'espèce un triangle équilatéral. Les constituants sont le protéide, le sel et l'eau. La variation de composition de la phase liquide serait représentée par une droite s'il n'y avait qu'un protéide; or, c'est une ligne brisée que l'on obtient. Ce résultat permet aux auteurs de conclure que le sérum des diverses espèces qu'ils ont étudiées peut être fractionné en divers protéides.

Parmi les autres substances utilisées encore dans le fractionnement des protéides sériques, signalons le chlorure de sodium (Schmidt [172]), l'acétate de sodium (Lewith [96]), le phosphate de potassium (Butler et Montgomery [32]), l'alcool (Tebb [198]), le fer colloïdal (Lunde et Wulfert [98]), le tannin (Lundin et Schröderheim [99]), le sulfate de cuivre (Kalcheva [82]) et le sulfite de sodium (Campbell et Hanna [34]).

Afin de rendre plus sélective l'utilisation de ces divers réactifs, certains auteurs conseillent de diluer préalablement le sérum [207] ou bien d'opérer à une certaine température [64].

Notons enfin que l'on peut encore séparer les deux grandes fractions protéidiques du sérum sanguin en utilisant l'ultrafiltration (Grabar [57]) ou la méhode d'étalement en films aux interfaces (Gorter et Blokfer [55]).

Il est facile de concevoir que toutes ces méthodes de fractionnement donnent des résultats extrêmement différents. Le problème est d'autant plus complexe que les termes « globulines » et « albumines » ont été appliqués selon les auteurs à des fractions protéidiques très différentes. Cette remarque a été faite depuis longtemps déjà, notamment par Rollet [162], Lambling [92], Dulière [47], Thiodet et Ribère [200] et Battut [13]; Machebœuf, Tayeau et Battut [117] ont étudié les diverses techniques de fractionnement des protéides sériques et ont comparé les résultats obtenus sur un même sérum. Ces résultats se sont révélés extrêmement différents et les auteurs concluent que « tant qu'une entente ne sera pas réalisée pour la définition des termes « globuline » et « albumine », il ne faut pas les utiliser sans préciser les détails de la technique qui a servi à obtenir la fraction protéidique que l'on envisage ».

Malgré ces réserves, la vieille technique d'Hofmeister mettant en jeu le sulfate d'ammonium semble donner les meilleurs résultats [13]. Néanmoins, elle ne reste pas exempte de critiques et, dans notre étude expérimentale, nous trouverons l'occasion de discuter les avantages et les inconvénients de cette méthode.

Concluons donc qu'il existe dans le sérum sanguin deux grandes fractions protéidiques différentes, les *globulines* et les *albumines*.

I. — Fractionnement des globulines

Nous avons eu précédemment l'occasion de rappeler les constatations faites par Burkhardt [31] à propos du fractionnement des protéides sériques. Cet auteur avait en effet remarqué que certains sels précipitent du sérum des protéides insolubles dans l'eau pure (considérés comme des globulines) et des protéides hydrosolubles qu'il considérait constitués par des albumines. Ayant repris les recherches de Burkhardt, Hammarsten [62] infirma cette conception

et montra que les protéides hydrosolubles précipités à l'aide de sulfate de magnésium à saturation possédaient bien tous les caractères des globulines.

Devait-on conclure, à la suite de ces recherches, qu'il existait des globulines insolubles et des globulines solubles dans l'eau pure ? Les recherches de Marcus Emil [120] permettent de répondre affirmativement à cette question.

Marcus Emil remarqua en effet que si l'on éliminait dans le sérum sanguin les globulines qui précipitent par dilution (Panum [133]), on obtenait encore un précipité important par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Les deux fractions ainsi obtenues reçurent les noms, la première d' « euglobuline », la seconde de « pseudoglobuline ».

On peut encore obtenir facilement ces deux fractions en portant à la dialyse contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée la fraction protéidique obtenue à l'aide du sulfate d'ammonium à demi-saturation. Dans ces conditions, les euglobulines s'insolubilisent tandis que les pseudoglobulines restent en solution [152]. Fuld et Spiro [53], puis Porges et Spiro [149] essayèrent de déterminer la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter au sérum pour ne précipiter que les globulines insolubles dans l'eau. Ils convinrent d'appeler « euglobulines » les protéides précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et « pseudoglobulines » les protéides précipitant entre le tiers et la demi-saturation. Les euglobulines ainsi obtenues sont-elles identiques à celles de Marcus Emil ? Freund et Joachim [52] prétendent qu'elles sont très différentes (*).

D'autres auteurs ont encore préconisé diverses méthodes dans le fractionnement des globulines : c'est ainsi que l'on rencontre dans la littérature les termes les plus variés : protéine visqueuse, homoglobuline, pseudomucoglobuline, globoglycoïde, etc. [28, 80, 171, 82, 203, 45, 71, 19, 18].

(*) Dans notre étude expérimentale, nous discuterons cette question.

Il importe de mentionner, parmi toutes ces recherches, celles de Tiselius [203] qui a pu, par électrophorèse, extraire du sérum trois fractions globuliniques qu'il a désignées par les lettres α, β et γ. Or, dans les immunsérums, seule la fraction γ contient les anticorps; grâce à ces constatations, il est possible aujourd'hui de préparer des immunsérums riches en anticorps et pauvres en protéides (dont on connaît le rôle néfaste en sérothérapie).

Dans un tout récent travail, Derrien, Roche et Mandel [44] ont pu isoler des globulines sept fractions différentes et, comme ces auteurs, il faut admettre que les globulines sériques constituent un système bien complexe.

Néanmoins, la plupart des chercheurs, en se basant soit sur des considérations physico-chimiques, soit sur des considérations immunologiques, continuent à admettre seulement l'existence de deux grandes fractions globuliniques, les « euglobulines » insolubles dans l'eau en l'absence de sels, les « pseudoglobulines » solubles dans l'eau en l'absence de sels.

Ces deux fractions présentent des propriétés différentes, ainsi que l'ont montré Seng [175] et Klobusitzky [88]. Malgré cela, de nombreux chercheurs se sont demandés si ces deux fractions étaient réellement différenciées et ils ont pensé que l'euglobuline pouvait être considérée comme un complexe [75] pouvant résulter de l'union de pseudoglobulines et de lipides (Samuely, Hardy [66], Handowsky et Wagner [65], Chick [36]) ou même simplement de pseudoglobulines et de phosphatides (Went et Farago [204], Went et Goreczky [205], Pirosky et Modern [145], Bendien et Snapper [14]).

Ayant pu mettre au point une méthode permettant de délipider sans les dénaturer les globulines du sérum sanguin, Machebœuf et Tayeau [112] ont pu montrer que la majeure partie des euglobulines perdait, par enlèvement des lipides qui leur étaient fixés, son insolubilité dans l'eau pure. Les euglobulines ne doivent donc le caractère d'inso-

lubilité dans l'eau, propriété qui sert à les définir, qu'à la présence de lipides qui leur sont liés.

Dans un récent travail, Tayeau [191] a décrit une technique permettant de détacher le cholestérol fixé aux protéides sans dénaturer ces derniers et sans libérer les phosphatides. Grâce à elle, l'auteur [193] est parvenu à démontrer que l'insolubilité dans l'eau pure des euglobulines était simplement due, comme l'avaient soupçonné certains auteurs [204, 205, 145], aux phosphatides fixés sur ces euglobulines.

Concluons donc que le problème du fractionnement des globulines se présente d'une manière très complexe (*) et qu'il est très difficile, pour le moment du moins, de considérer les globulines comme un mélange de protéides très différents.

II. — Fractionnement des albumines

Le problème du fractionnement des albumines sériques parut très simple à la suite des travaux de Guerber [59], qui parvint à obtenir les albumines à l'état cristallisé.

Cependant, les biochimistes ne tardèrent pas à montrer que les albumines constituaient un ensemble très complexe et l'on chercha tout naturellement, en utilisant les techniques les plus variées, à fractionner les albumines du sérum. Les sels, et le sulfate d'ammonium en particulier, furent mis à contribution. Malgré les critiques de Hougardy [79], certains auteurs purent ainsi isoler trois fractions albuminiques (Halliburton [61]), d'autres deux (Oppenheimer [132], Goldschmidt et Kahn [54], Blankenstein et Fischer [20], Keckwick [84], Balint [12]), d'autres enfin un grand nombre (Luetscher [97], Derrien, Roche et Mandel [44]).

L'existence de fractions diverses dans les albumines séri-

(*) Notons que la fraction globuline du sérum contient l'haptoglobine qui active l'oxydation péroxydasique de l'hémoglobine (Polonovski et Jayle [147]).

ques peut s'expliquer à la lumière des recherches effectuées, dès 1928, par Machebœuf [101], recherches poursuivies plus tard par Sandor, Bonnefoi et Pérez [169], Sandor, Bonnefoi et Goret [168] et enfin Duboy [46], qui ont étudié en détail la précipitation des albumines par le sulfate d'ammonium en fonction du pH. A la suite des recherches de ces auteurs, on peut conclure qu'il existe dans les albumines au moins trois fractions présentant des pH isoioniques différents et constituées l'une par des albumines libres, les autres par des cénapses lipidoprotéidiques (*).

Il est donc fort probable que les fractions isolées des albumines sériques ne diffèrent entre elles que par la nature et la quantité des substances (lipides et glucides) liées aux protéides (Machebœuf et Duboy [106]) (**). Machebœuf et Januskiewicz [107] ont d'ailleurs montré que diverses fractions albuminiques, qui possèdent des points isoioniques différents, étaient constituées par des protéides identiques (ayant même point isoionique et même action sur les équilibres de membrane). A la suite de ses recherches sur l'électrophorèse des albumines sériques, Tiselius [202] est parvenu à une conclusion identique à celle de Machebœuf et ses élèves.

Il semble donc très difficile, pour le moment tout au moins, de conclure à l'existence de fractions bien différenciées dans les albumines. Aussi nous bornerons-nous, dans un point de vue pratique, à considérer simplement deux grandes fractions protéidiques sériques, les *globulines* et les *albumines*, qui sont très différentes l'une de l'autre.

(*) On appelle cénapses [104] des ensembles complexes résultant de l'union des protéides avec d'autres constituants de la matière vivante (Machebœuf).

(**) Parmi toutes ces substances, les phosphatides joueraient un rôle primordial grâce aux fractions ionisées qu'ils apportent (Tayeau [194]).

III. — Différenciations entre globulines et albumines

Les globulines diffèrent des albumines par de très nombreux caractères.

1° Par leur composition centésimale (Hammarsten [63], Malerba [119], Piettre [141], Metzger [122], Hewitt [68]).

Voici, d'après Hammarsten, cette composition (*) :

	Globulines	Albumines
Carbone	52,52 à 53,30	53,08 p. 100
Hydrogène	6,68 à 7,13	7,10 —
Azote	15,61 à 16,25	15,93 —
Soufre	1,11 à 1,12	1,90 —
Oxygène	»	21,86 —

2° Par leur teneur en amino-acides (Abder-Halden [1] et Abder-Halden et Kömm [2]).

	Globulines	Albumines
Glycocolle	3,5 p. 100	» p. 100
Alanine	2,2 —	2,7 —
Leucine	18,7 —	20,0 —
Tyrosine	2,5 —	2,0 —
Phénylalanine	3,8	3,1 —
Sérine	» —	0,6 —
Cystine	1,5 —	2,3 —
Proline	2,8 —	1,0 —
Acide aspartique	2,5 —	3,1 —
Acide glutamique	8,5 —	7,7 —

3° Par leur poids moléculaire qui peut être déterminé

(*) Les tableaux de ce chapitre sont empruntés à un récent travail de Tayeau [191]).

par diverses techniques (tension superficielle, pression osmotique, ultracentrifugation).

GLOBULINES	ALBUMINES	TECHNIQUES	AUTEURS
80.000 à 140.000	45.000	Pression osmotique...	Sœrensen (1925)
103.800	67.500	Ultracentrifugation ...	Svedberg et Sjœgren (1928) [182]
»	68.000	Pression osmotique...	Adair et Robinson (1930) [9]
»	66.000	Tension superficielle..	De Caro et Laporta (1930) [35]
148.000	»	Ultracentrifugation ...	Von Mutzenbecher (1933) [126]
140.000	69.000	Ultracentrifugation ...	Von Mutzenbecher et Svedberg (1933) [128]
138.000	»	Ultracentrifugation ...	Von Mutzenbecher (1934) [127]
150.000	»	Pression osmotique...	Roche et Bracco (1934) [156, 157]
»	69.000	Pression osmotique...	Roche et Marquet (1935) [160] et Roche, Dorier et Marquet (1935) [158]
»	74.000	Pression osmotique...	Burk (1932) [30]
173.000	»	Pression osmotique...	Burk (1937)

4° Par leur point isoélectrique et leur point isoionique.

Sandor [167] a trouvé les chiffres suivants comme point isoionique du sérum de Cheval :

Globulines : entre 5,8 et 6,0.
Albumines : entre 5,10 et 5,14 (*).

Notons enfin que la différenciation entre les globulines et les albumines peut être nettement mise en évidence par l'électrophorèse (Keckwick [84], Reboul [154]).

Il existe donc dans le sérum sanguin deux fractions

(*) Nous aurons l'occasion, dans notre partie expérimentale, de revenir sur ces chiffres.

protéidiques très nettement différenciées, les *globulines* et les *albumines* (*), et il semble, si l'on en croit certains auteurs (Battut [13]), que ce soit la technique au sulfate d'ammonium qui permette d'obtenir les résultats les plus satisfaisants.

Cette conception correspond-elle à la réalité ? Les fractions obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium sont-elles homogènes et cette technique mérite-t-elle son utilisation en clinique ?

Nous avons voulu répondre à ces questions et, pour cela, nous avons effectué une série de recherches expérimentales qui font l'objet de notre travail.

(*) On a cru pendant un certain temps à la transformation facile de ces deux fractions l'une en l'autre. Fischer [49] avait en effet remarqué que si au sérum on ajoute de l'héparine, on voit une partie des albumines se transformer en globulines. Cette conclusion était nettement exagérée, car Sandfort, Hoster et Boyd [164] et Von Mutzenbecher et Svedberg [128] ont montré qu'il s'était formé un complexe héparine-albumine, qui était devenu insoluble dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation, mais qui immunologiquement, physiquement et chimiquement, possédait encore à peu près toutes les propriétés des albumines.

DEUXIÈME PARTIE

PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISÉES

Nous désirons, dans ce chapitre, consacrer une place toute particulière au point isoionique et à sa détermination, cette notion jouant dans nos recherches un rôle primordial.

I. — Point isoionique des protéides

A plusieurs reprises, nous avons eu l'occasion de constater, avec Sandor [167], que le point isoionique d'un protéide, pH pour lequel celui-ci n'émet pas et n'absorbe pas d'ions H^+ [180], était une constante plus significative et plus fidèle que le point isoélectrique (*). C'est pourquoi, dans l'étude que nous trouverons exposée plus loin, nous avons choisi cette constante pour examiner le degré de pureté des fractions protéidiques que nous avons étudiées.

Considérations. — Il importe, avant toute chose, d'établir une distinction entre deux notions voisines, le point isoélectrique et le point isoionique. On appelle point isoélectrique

(*) Si l'on désigne un colloïde amphotère par la formule suivante : HO - NH_3 - R - COOH, on admet qu'en dessous de son point isoélectrique, le colloïde est ionisé positivement OH - + ^+H_3N - R - COOH et qu'au-dessus de son pH isoélectrique, il est ionisé négativement H^+ + HO - NH_3 - R - COO -. Comment se fait-il donc que l'on ne fait pas intervenir les ions OH - dans la définition des points isoioniques ? C'est que l'on admet aujourd'hui [29] que les protéides ne réagissent qu'avec les ions H^+. Leur ionisation ne dépendra que de l'adsorption d'ion H^+ : HOOC - R - NH_2 + H^+ → HOOC - R - NH_3^+.

d'un protéide le pH pour lequel ce protéide est électriquement neutre; à ce pH, le protéide placé dans un champ électrique ne se déplace ni vers l'anode, ni vers la cathode (électrophorèse). Si la charge d'un protéide ne dépendait essentiellement que de l'émission ou de l'adsorption d'ions H+ et OH—, point isoélectrique et point isoionique seraient confondus, mais comme le protéide fixe généralement des ions différents de ceux de l'eau, les deux points ne coïncideront plus puisque la charge électrique peut dépendre d'autres éléments en plus des ions H+ et OH—; on sait, en effet, que le point isoélectrique des protéides dépend non seulement de la nature, mais encore de la concentration des petits ions dissous dans leur solution [183, 8]. Or, ces petits ions rentrent dans la constitution même d'un protéide; dans ces conditions, « le point isoionique aura plus de signification que le point isoélectrique qui, lui, peut dépendre, à priori, d'affinités variables ou de questions d'adsorption plus ou moins accidentelles d'impuretés ioniques diverses » (Sandor) (*).

Sandor a indiqué une méthode de détermination exacte des points isoioniques.

Cette méthode consiste à transformer les protéides afin qu'ils ne contiennent que des ions sodium, puis à doser la quantité de sodium liée au protéide et, après avoir ajouté une dose d'acide équivalente à ce sodium, à prendre le pH de la solution [40].

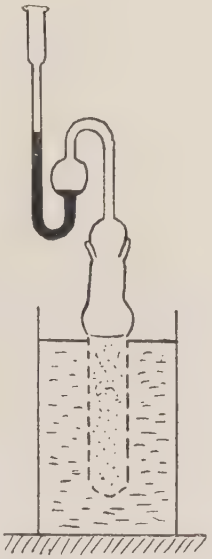
Mode opératoire. — Pour la détermination des points isoioniques, on dispose de dialyseurs en collodion (**) montés sur des supports permettant de dialyser sous une pression de mercure pouvant atteindre 15 à 20 centimètres. Ces supports en verre sont constitués de deux pièces qui s'emboîtent à l'aide d'un rôdage. La pièce supérieure est

(*) Un fort intéressant mémoire de Sandor [167] discute la théorie du pH isoionique.

(**) Pour la fabrication des dialyseurs, voir les thèses de Pérez [136], Battut [13], Duboy [46].

recourbée en S et porte dans sa partie intermédiaire un élargissement en boule. Sur la partie inférieure est monté le dialyseur en collodion. La dialyse est effectuée à la glacière et sous une couche de toluène [177].

C'est dans un tel dialyseur qu'est placée la solution de protéide dont on veut déterminer le point isoionique. Le dialyseur plonge tout d'abord dans une solution de sulfate de sodium à 1 p. 100 (remplacement des cations par le cation sodium). Cette solution est changée une fois par jour et la dialyse continuée pendant trois jours.



La dialyse est alors poursuivie contre de l'eau distillée renouvelée deux fois par jour pendant quatre jours [166, 170].

On recueille ensuite la solution protéidique et, sur une partie aliquote, on procède au dosage du cation sodium par titrage de l'alcalinité des cendres.

La fraction prélevée est calcinée dans une capsule de platine; les cendres obtenues sont dissoutes dans de l'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un excès d'acide sulfurique N/40; on titre alors en retour jusqu'au virage au jaune du rouge de méthyle à l'aide de soude N/40. On calcule ensuite la quantité d'acide N/40 à ajouter au reste de la solution pour neutraliser l'alcalinité, puis on prend le pH de la solution ainsi obtenue (*). Ce pH représente le point isoionique.

Remarque. — Si l'on a affaire à des globulines, dont une partie risque d'être insoluble dans l'eau à son point isoionique, il faut neutraliser la solution de globulines une

(*) Nos déterminations de pH ont été faites au potentio-pH-mètre de Jouan.

fois par jour pendant toute la durée de la dialyse contre de l'eau distillée, à l'aide de soude diluée jusqu'au virage vert franc du bleu de bromothymol (pH 7,4) (*).

En utilisant cette technique, on arrive à déterminer le point isoionique des protéides avec une erreur ne dépassant pas 0,03 pH pour les albumines et 0,05 pH pour les globulines.

II. — Séparation des globulines et des albumines du sérum

A un volume déterminé de sérum, on ajoute un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée. Ces globulines précipitent; on les recueille par centrifugation. Les eaux-mères sont mises de côté.

Pour purifier les globulines, on les redissout dans un peu d'eau distillée, puis on les précipite de nouveau par une quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium égale au volume d'eau distillée qui avait été nécessaire pour redissoudre les globulines. Celles-ci sont recueillies par centrifugation. Les eaux-mères ajoutées aux précédentes vont être utilisées pour la précipitation des albumines.

Pour cela, on ajoute un léger excès de sulfate d'ammonium jusqu'à l'apparition d'un léger louche, puis de l'acide sulfurique normal, jusqu'au virage du bleu très pâle d'un papier au rouge Congo (pH 3,9). Dans ces conditions, les albumines précipitent; il ne reste plus qu'à les recueillir par centrifugation et à éliminer les eaux-mères après avoir vérifié qu'elles ne contiennent plus de protéides. Le précipité d'albumine ainsi obtenu se dissout très facilement dans de l'eau légèrement ammoniacale. Ces deux fractions globulines et albumines contiennent d'importantes quantités de lipides qu'il faut éliminer pour le dosage des protéides.

(*) Notons que pour la détermination du pH isoionique, la concentration du protéide doit être plus élevée que 2 p. 100.

III. — Dosage des protéides

Les fractions protéidiques sont coagulées et épuisées à l'aide d'alcool, puis d'éther; elles sont ensuite traitées par l'eau (élimination des sels et d'autres substances hydrosolubles), desséchées et pesées (*).

IV. — Dosage du cholestérol

Il a été effectué grâce à la réaction de Liebermann-Burchard (*).

V. — Préparation des globulines purifiées

Les globulines purifiées que nous avons utilisées dans notre étude ont été obtenues par le sulfate d'ammonium à demi-saturation en ajoutant à un volume connu de sérum son volume d'une solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium. Les globulines précipitées ont été lavées par trois dissolutions successives dans l'eau distillée suivies à chaque fois par une précipitation par le sulfate d'ammonium; finalement, elles ont été dissoutes dans le volume minimum d'eau distillée nécessaire pour opérer la dissolution intégrale [167].

VI. — Préparation des albumines cristallisées

L'albumine fut cristallisée à partir des eaux-mères de précipitation des globulines. Sur une fraction aliquote de ces eaux-mères, on effectue une courbe de titration potentiométrique, puis on ajoute au reste de ces eaux-mères la quantité nécessaire d'acide sulfurique normal pour amener

(*) On trouvera tous les détails de la technique dans une récente publication de Tayeau [191].

le pH vers 5,1. On finit d'ajuster à pH 4,8 par de l'acide sulfurique N/5. On laisse la solution à la glacière pendant vingt-quatre heures, puis pendant les quarante-huit heures qui suivent à la température du laboratoire. Les cristaux ainsi obtenus contiennent encore beaucoup d'éléments amorphes. Pour les en débarrasser, nous avons employé deux procédés successifs :

1° Nous avons centrifugé la solution à faible vitesse (1.000 tours à la minute au maximum) pendant une ou deux minutes seulement, puis nous avons lavé les cristaux qui se déposèrent deux à trois fois de suite par une solution de sulfate d'ammonium à demi-saturation et à pH 4,8 en centrifugeant toujours à une faible vitesse et pendant très peu de temps. Ainsi, une partie des éléments amorphes reste en suspension dans les eaux de lavage puisque leur densité est relativement très faible et qu'ils ont une taille exiguë.

2° Les cristaux lavés sont dissous dans 30 à 40 cm^3 d'eau distillée seulement pour 1 litre de sérum et à un pH qui n'a pas dépassé 5,3 à 5,4. De cette façon, tout ce qui est à l'état cristallin, donc éminemment soluble dans l'eau, est dissous tandis que les éléments amorphes restent insolubles; on les élimine en centrifugeant la solution à très grande vitesse pendant quinze à vingt minutes, puis en filtrant la fraction décantée. Dans celle-ci, l'albumine est cristallisée encore une fois en présence du sulfate d'ammonium à demi-saturation et à pH 4,8 [167].

VII. — Délipidation des protéides sans dénaturation

Pour effectuer la délipidation de nos fractions protéidiques sans dénaturer les protéides, nous avons utilisé la méthode de Saias [163], basée sur les recherches de Pietre [141] et Adnot [11].

Cette technique consiste à épuiser la solution protéidique

à délipider par de l'acétone anhydre à — 5° (*). A 10 cm³ de solution protéidique refroidie à 0°, on ajoute en mélangeant rapidement 25 cm³ d'acétone anhydre à — 5°. Dans ces conditions, la température ne monte pas au-dessus de + 4° après mélange et centrifugation. Le précipité de protéine est séparé par centrifugation de trente secondes à 2.500 tours. L'acétone est décantée par renversement du tube et le précipité lavé deux fois par 7 cm³ d'acétone à — 5°. Les séparations sont effectuées par centrifugation. Il est nécessaire de bien broyer le précipité sous l'acétone pour éviter les grumeaux.

Les lavages à l'acétone sont suivis de trois lavages avec 10 cm³ d'éther anhydre à 0° pour chacun d'eux. Après chaque lavage, on centrifuge trente secondes à 2.500 tours et on décante l'éther. Après la dernière centrifugation, l'éther est éliminé par un courant d'azote.

Grâce à cette technique, on arrive à obtenir des fractions protéidiques qui ont été privées de la majeure partie des lipides qu'elles contenaient et qui ont conservé leur solubilité dans l'eau.

(*) Nous avons utilisé pour réfrigérer un mélange de glace et de sel marin.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

CHAPITRE PREMIER

La précipitation des protéides sériques par le sulfate d'ammonium

Au cours de notre étude historique, nous avons passé en revue les diverses techniques proposées pour le fractionnement des protéides sériques.

Parmi toutes ces techniques, celle mettant en jeu l'action du sulfate d'ammonium semble, selon certains auteurs [159], justifier la préférence dont elle est l'objet.

A la suite des belles recherches d'Hofmeister [72 à 74], dont nous avons fait mention précédemment, un certain nombre de chercheurs ont repris en détail l'action du sulfate d'ammonium sur la précipitation des protéides du sérum et ont généralement confirmé l'existence de deux grandes fractions protéidiques, les globulines et les albumines. Cependant, les travaux de ces auteurs, sur lesquels nous reviendrons longuement plus tard, ne sont pas toujours d'accord sur les concentrations en sulfate d'ammonium nécessaires pour obtenir les diverses fractions du sérum. Il est vrai que les conditions expérimentales dans lesquelles ils ont opéré étaient parfois bien différentes. De plus, leurs essais n'ont pas toujours porté sur des sérums issus d'une même espèce animale. C'est pourquoi, dans ce premier chapitre, nous avons décidé d'étudier systémati-

quement la précipitation des protéides sériques en fonction de la concentration du milieu en sulfate d'ammonium, en envisageant non seulement les protéides totaux, comme l'avaient fait la plupart des auteurs, mais encore les protéides insolubles et solubles dans l'eau pure. Nos recherches ont porté sur le sérum de Cheval, puis sur le sérum d'Homme normal.

I. — Essais sur le sérum de Cheval

Dans une première série d'essais, nous avons préparé un certain nombre d'échantillons de sérum de Cheval. Chacun de ces échantillons a été amené à un titre déterminé en sulfate d'ammonium par addition d'un certain volume de solution saturée de ce sel et ajustée à pH 7,3 (*).

Nous avons ainsi effectué les mélanges suivants :

	NUMÉRO						
	1	2	3	4	5	6	7
Sérum de Cheval (cm³)	100	100	100	100	100	50	25
Solution saturée en sulfate d'ammonium (cm³) (**).	14,5	34	54	70	100	75	87
Titre en $SO_4(NH_4)_2$ de la solution (en prenant la saturation pour unité).	0,125	0,25	0,35	0,40	0,50	0,60	0,77

(*) Afin de savoir quelle est la quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium à ajouter à un certain volume de sérum pour obtenir un titre déterminé (en prenant la saturation pour unité), on peut appliquer la formule suivante :

$$x = \frac{TV}{1 - T}$$ où { x = volume (en cm³) de la solution saturée en sulfate d'ammonium; V = volume du sérum (en cm³); T = titre à obtenir.

(**) Notons que la solution de sulfate d'ammonium a été ajoutée au sérum par petite portion et en agitant continuellement.

Nous avons enfin préparé un huitième échantillon en saturant à l'aide de sulfate d'ammonium pulvérisé 50 cm^3 de sérum (précipitation des protéides totaux).

Après un quart d'heure de contact, chaque mélange est porté à la centrifugation jusqu'à ce que le liquide surnageant soit limpide (*).

Après élimination des eaux-mères (**) de centrifugation, chaque précipité est redissous dans quelques centimètres cubes d'eau et porté à la dialyse sous pression et en glacière, contre de l'eau ordinaire d'abord, puis contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée (***).

La dialyse est poursuivie jusqu'à ce que les ions SO_4-- soient totalement éliminés (****). Elle demande environ six jours.

Dans chaque dialyseur, il s'est formé un précipité. Le contenu de chaque dialyseur est placé dans un tube à centrifuger taré (*****), puis soumis à la centrifugation. On sépare ainsi la fraction insoluble, qui s'est rassemblée au fond du tube et qui est prête à analyser, et la fraction soluble que l'on transvase dans une autre série de tubes à centrifuger tarés. Il faut maintenant précipiter au sein du liquide la fraction protéidique qui s'y trouve dissoute.

Dans les premiers tubes, cette fraction est constituée surtout par des globulines; dans les autres, il y a non seulement des globulines, mais encore des albumines. Pour effectuer la précipitation de l'ensemble, on ajoute un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium très légèrement

---

(*) Avec une centrifugeuse à 6.000 tours-minute, l'opération demande environ un quart d'heure. Seul, le n° 8, en raison de la densité élevée du mélange, a demandé demi-heure.

(**) Dans les eaux-mères de l'échantillon n° 8, nous avons eu soin de vérifier, à l'aide d'une solution d'acide trichloracétique, l'absence totale de protéides.

(***) Et en présence de toluène, afin d'éviter les putréfactions [177].

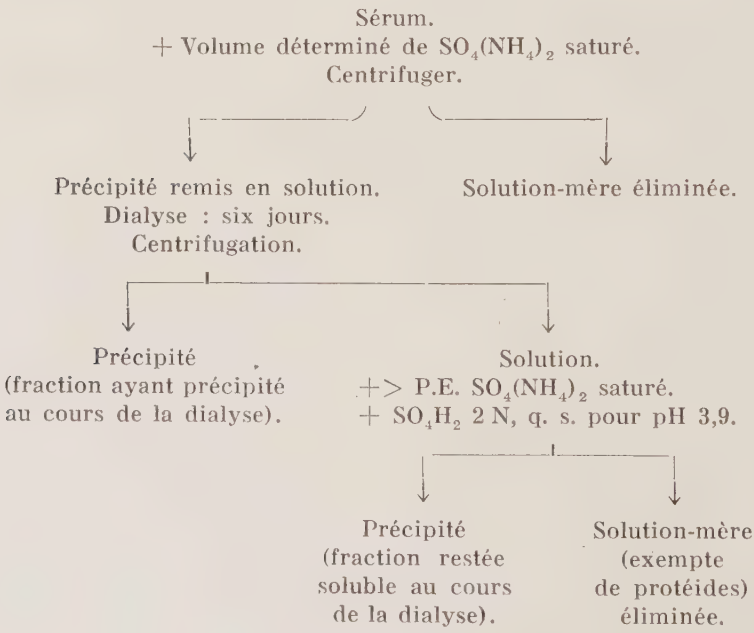
(****) Pour cela, on prélève quelques centimètres cubes du liquide auxquels on ajoute quelques gouttes d'une solution de chlorure de baryum à 5 p. 100. En l'absence d'ions SO_4--, aucun louche n'apparaît.

(*****) On a bien soin de rincer chaque dialyseur à l'aide d'eau distillée et de joindre les eaux de rinçage au reste de la fraction.

supérieur au volume du liquide qui se trouve déjà dans le tube. On obtient ainsi la précipitation des globulines, puis on ajoute en agitant quelques gouttes d'acide sulfurique 2 N jusqu'à ce que le pH du milieu atteigne 3,9 (virage au bleu violacé d'un papier au rouge Congo) ; dans ces conditions, les albumines précipitent à leur tour [101]. On centrifuge et, avant d'éliminer les eaux-mères, on vérifie qu'elles ne contiennent plus traces de protéides.

Nous avons ainsi deux séries de tubes : la première série contient les fractions qui se sont insolubilisées au cours de la dialyse, la deuxième série contient les fractions qui sont restées solubles.

Le tableau suivant schématise les opérations que nous venons de décrire :



Dans toutes les fractions ainsi obtenues, on effectue un dosage de protéides et de lipides (*). Dans le tableau I

(*) Dans les tubes de la seconde série, on ajoute quelques gouttes

sont rassemblés les résultats que nous avons obtenus dans l'une de nos expériences (*). Ils correspondent à 100 cm³ de sérum traité (pour chaque échantillon).

TABLEAU I

N°	TITRE EN $SO_4(NH_4)_2$ (on prend la saturation pour unité)	1 PROTÉIDES TOTAUX PRÉCIPITÉS (G.)	2 PROTÉIDES INSOLUBLES DANS L'EAU PRÉCIPITÉS (G.)	3 PROTÉIDES SOLUBLES DANS L'EAU PRÉCIPITÉS (G.)	SUBSTANCES LIPOÏDIQUES LIÉES A LA FRACTION 1 (MG.)	SUBSTANCES LIPOÏDIQUES LIÉES A LA FRACTION 2 (MG.)	SUBSTANCES LIPOÏDIQUES LIÉES A LA FRACTION 3 (MG.)
1	0,125	0	0	0	0	0	0
2	0,25	0,247	0,112	0,135	17,2	13,5	3,7
3	0,35	»	»	2,231	22,0	5,0	17,0
4	0,40	2,510	0,239	2,271	44,1	11,4	32,7
5	0,50	4,480	0,213	4,367	102,9	13,4	89,5
6	0,60	3,979	0,219	3,760	103,0	10,8	92,2
7	0,77	3,913	0,212	3,701	96,0	13,6	82,4
8	1,00	5,787	0,221	5,566	172,4	16,6	155,8

Au tableau I correspondent les courbes des figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6 (voir p. 44 et 45).

Remarque. — On est frappé, en examinant nos résultats expérimentaux, par les chiffres qui correspondent, dans notre expérience, aux protéides insolubles dans l'eau distillée. Ces chiffres sont, en effet, très nettement inférieurs à ceux que l'on trouve habituellement dans la littérature scientifique [165]. Ceci doit être dû, nous semble-t-il, à la nourriture insuffisante à laquelle ont été soumis les Chevaux dès 1940. Depuis cette époque, en effet, la presque totalité des sérums de Chevaux que nous avons traités se

d'ammoniaque diluée, afin de ramener le pH aux environs de la neutralité avant d'effectuer les dosages. Si l'on ne prenait pas cette précaution, les extraits alcooloéthérés obtenus pour le dosage des lipides contiendraient de l'acide sulfurique qui, au cours de l'évaporation de l'alcool et de l'éther, dénaturerait profondément les substances lipoïdiques.

(*) Nous avons effectué, en effet, plusieurs expériences identiques; les résultats que nous avons obtenus sont superposables.

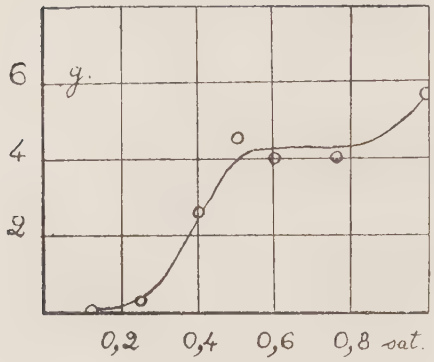


FIG. 1.

Courbe représentative des variations des poids (g.) de protéides totaux précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

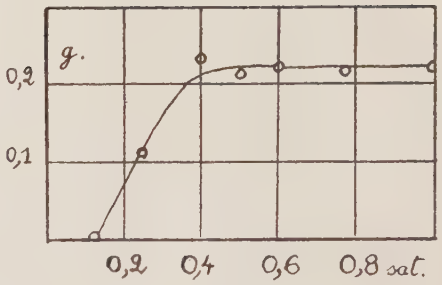


FIG. 2.

Courbe représentative des variations des poids (g.) de protéides insolubles dans l'eau distillée, précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

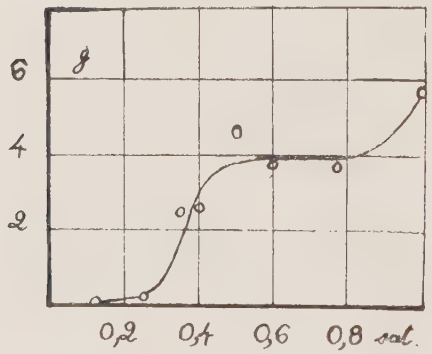


FIG. 3.

Courbe représentative des variations des poids (g.) de protéides solubles dans l'eau distillée, précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

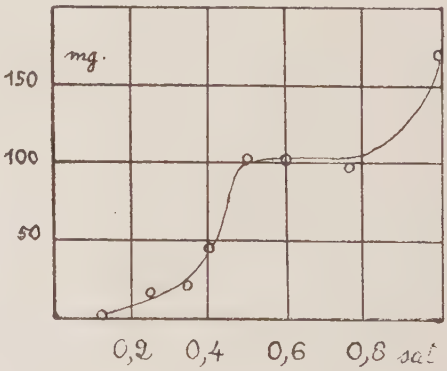


FIG. 4.

Courbe représentative des variations des poids (mg.) de substances lipoïdiques liées aux protéides totaux précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

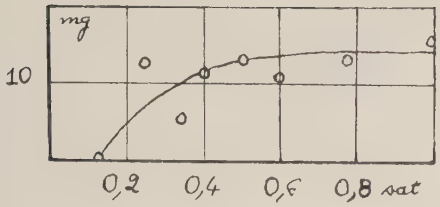


FIG. 5.

Courbe représentative des variations des poids (mg.) de substances lipoïdiques liées aux protéides insolubles dans l'eau précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

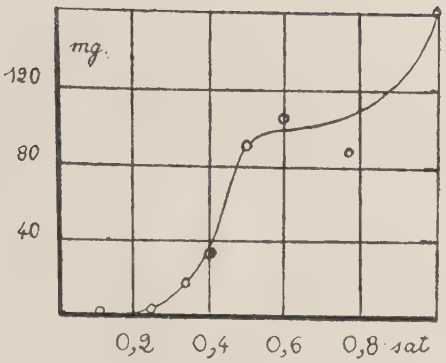


FIG. 6.

Courbe représentative des variations des poids (mg.) de substances lipoïdiques liées aux protéides solubles dans l'eau précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

sont montrés très pauvres non seulement en protéides, mais surtout en euglobulines.

Nous nous sommes demandée si cette faible teneur en euglobulines n'apportait pas de modification importante dans l'allure générale de nos courbes.

Il n'en est rien, ainsi que le montrent les résultats ci-dessous extraits d'une autre de nos expériences et correspondant à un des rares sérums de Chevaux que nous avons examinés et ayant montré une teneur en euglobulines plus élevée (tableau II et courbe de la figure 7) (voir p. 46).

Dans cette même expérience, nous avons dosé les substances lipoïdiques liées aux protéides et le cholestérol contenu dans ces substances.

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés également dans le tableau II qu'illustrent les courbes de la figure 8.

Nos résultats correspondent toujours à 100 g. de sérum traité.

TABLEAU II

NUMÉRO	TITRE EN $SO_4(NH_4)_2$ (on prend la saturation pour unité)	PROTÉIDES INSOLUBLES DANS L'EAU PURE ET PRÉCIPITÉS (G.)	SUBSTANCES LIPOÏDIQUES LIÉES A CES PROTÉIDES (MG.)	CHOLESTÉROL LIÉ A CES PROTÉIDES (MG.)
1	0,125	0	0	0
2	0,25	0,353	65,3	22,8
3	0,30	0,305	62,3	25,0
4	0,35	0,700	81,7	28,5
5	0,40	0,739	81,1	25,2
6	0,45	0,776	84,9	25,7
7	0,50	0,738	78,6	26,2
8	0,70	0,840	»	»
9	1,00	0,762	86,2	36,8

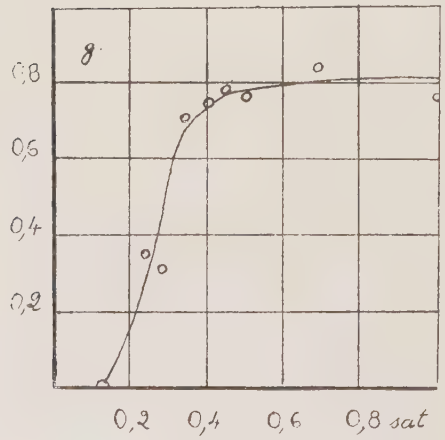


FIG. 7.

Courbe représentative des variations des poids (g.) de protéides insolubles dans l'eau distillée, précipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

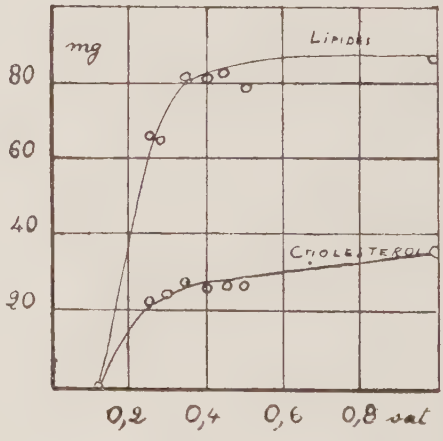


FIG. 8.

Courbes représentatives des variations des poids (mg.) de substances lipoïdiques et de cholestérol liés aux protéides insolubles dans l'eau distillée, pricipités de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel (la saturation étant prise pour unité).

Avant de passer à l'interprétation de nos expériences, nous allons décrire les recherches que nous avons effectuées sur les sérums d'Homme normal.

II. — Essais sur le sérum d'Homme

Il est pratiquement impossible d'effectuer sur un sérum humain une expérience identique à celles que nous avons pratiquées sur des sérums de Chevaux, étant donné le petit volume de sang dont on peut disposer.

Grâce à une saignée faite chez un hypertendu (*), nous avons pu disposer d'un échantillon de sérum humain mesurant un volume de 100 cm³ environ, ce qui nous a permis de faire une première expérience.

Grâce à un excès de sang prélevé au cours d'une transfusion, nous avons pu effectuer une seconde expérience sur 60 cm³ de sérum humain. Cette deuxième expérience, que nous ne rapportons pas ici, a confirmé les résultats de la première. Dans celle-ci, nous avons effectué les mélanges suivants :

	NUMÉRO						
	1	2	3	4	5	6	7
Sérum d'Homme (cm³)	20	10	20	30	10	10	10
Solution saturée en sulfate d'ammonium (cm³)	5	3,4	10	25	12,5	20	30
Titre en $SO_4(NH_4)_2$ de la solution (en prenant la saturation pour unité).	0,20	0,25	0,33	0,45	0,55	0,66	0,75

(*) Nous adressons nos remerciements à notre camarade Eugène Neuzil qui nous a procuré ce sérum.

Nous avons eu soin, de plus, de pratiquer sur un échantillon du sérum un dosage de protéides et de lipides totaux (ce qui correspond aux protéides et lipides précipités lorsque le sérum est saturé en sulfate d'ammonium).

Après un quart d'heure de contact, chaque mélange a été porté dans un tube taré et centrifugé jusqu'à ce que le liquide surnageant soit limpide.

Après élimination des eaux-mères, nous avons effectué sur chaque fraction ainsi obtenue un dosage de protéides et de lipides.

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau III (ils sont ramenés pour chaque échantillon à 100 g. de sérum traité).

TABLEAU III

NUMÉRO	TITRE EN $SO_4(NH_4)_2$ (on prend la saturation pour unité)	PROTÉIDES PRÉCIPITÉS (G.)	LIPIDES LIÉS AUX PROTÉIDES (G.)
1	0,20	0	0
2	0,25	Traces indosables	Traces indosables
3	0,33	1,128	0,063
4	0,45	2,887	0,259
5	0,55	3,906	0,517
6	0,66	6,137	0,628
7	0,75	6,205	0,527
8	1,00	7,198	0,892

Au tableau III correspondent les courbes des figures 9 et 10.

Interprétation et discussion

L'examen de nos résultats et de nos courbes permet d'apporter quelques éclaircissements dans le fractionne-

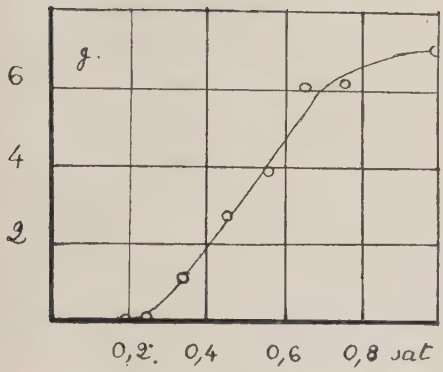


FIG. 9.

Courbe représentative des variations des poids de protéides précipités de 100 cm³ de sérum humain en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium (la saturation étant prise pour unité).

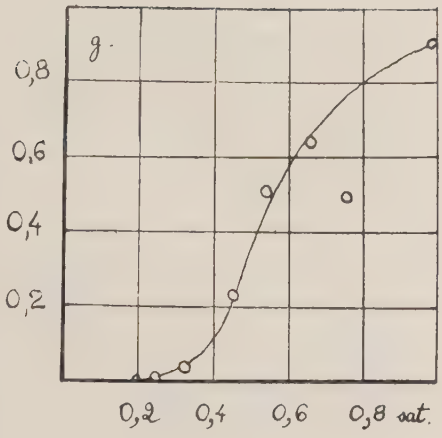


FIG. 10.

Courbe représentative des variations des poids de substances lipoïdiques fixées aux protéides précipités de 100 cm³ de sérum humain en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium (la saturation étant prise pour unité).

ment des protéides sériques et d'expliquer quelques-unes des divergences qui existent entre les conclusions des divers auteurs.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude sur le sérum de Cheval nous permettent de constater que la précipitation des protéides a toujours commencé, dans toutes nos expériences, lorsque la concentration du sérum en sulfate d'ammonium a atteint le taux de 0,25 saturé. Divers auteurs [155] indiquent généralement le taux de 0,30.

Puis, brusquement, dès que la concentration en sel atteint le taux de 0,30, le poids de protéides précipités augmente rapidement jusqu'à ce que la concentration en sulfate d'ammonium atteigne le taux de saturation de 0,50. Vient-on à ajouter au milieu du sulfate d'ammonium et l'on constate que le précipité protéidique n'augmente plus. A ce moment, il faut beaucoup élever la concentration

saline (0,75) pour qu'une nouvelle fraction protéidique commence à précipiter.

Le palier que l'on remarque dans nos courbes au voisinage de la demi-saturation en sulfate d'ammonium avait déjà été signalé par Kauder [83], puis par Hofmeister [72 à 74]. Il fut confirmé plus tard par Schmitz [173].

Ce palier correspond à une saturation du milieu en sulfate d'ammonium comprise entre 0,5 et 0,7. Ce chiffre est très légèrement différent de celui indiqué par certains auteurs.

Comment expliquer cette discordance ?

Les intéressantes recherches de Schmitz [173] nous permettent de répondre à cette question. Cet auteur signale, en effet, que si le sérum a été préalablement plus ou moins dilué, le palier peut se situer en des points assez variables.

Or, de nombreux chercheurs [161] conseillent, avant d'effectuer la précipitation des protéides sériques, de diluer préalablement le sérum et d'opérer à un pH très légèrement acide. Ceci explique sans doute la très légère discordance qui existe entre les chiffres publiés par certains auteurs et les nôtres.

Si nous examinons maintenant les courbes des figures 2 et 3, nous constatons, comme l'ont fait Fuld et Spiro [53] et Porges et Spiro [149], que le sulfate d'ammonium au tiers de saturation précipite la totalité des euglobulines, c'est-à-dire des protéides insolubles dans l'eau pure. Mais insistons sur le fait que le précipité obtenu dans ces conditions est loin d'être constitué uniquement par des euglobulines comme l'ont pensé les auteurs précités. Il contient une abondante quantité de pseudoglobulines.

La courbe de la figure 3 montre, en effet, que lorsque la concentration en sulfate d'ammonium atteint le tiers de la saturation, 2,22 g. environ de pseudoglobulines (pour 100 cm^3 de sérum) ont été précipités.

De plus, constatons que la fraction qui précipite entre le tiers et la demi-saturation en sulfate d'ammonium est bien

constituée par des pseudoglobulines, mais qu'elle ne représente qu'une faible proportion de ces protéides, puisqu'une importante partie de cette fraction a déjà précipité au tiers de saturation. Cette remarque infirme encore une des conclusions de Porges et Fuld et de Fuld et Spiro (voir p. 24).

Signalons encore que l'examen des courbes des figures 4, 5 et 6 montre que les protéides entraînent dans leur précipitation des substances lipoïdiques fixées sur eux sous forme de cénapses lipidoprotéidiques (Machebœuf).

La précipitation de ces substances lipoïdiques suit de très près celle des protéides sur lesquels elles sont adsorbées.

Mentionnons toutefois que les fractions insolubles dans l'eau entraînent dans leur précipitation plus de lipides (environ 5 à 6 p. 100) que les fractions solubles dans l'eau (2,5 à 3 p. 100).

Signalons enfin, grâce à l'examen de la figure 8, que la précipitation du cholestérol est à peu près parallèle à celle des substances lipoïdiques totales.

Nos recherches effectuées sur le sérum humain nécessitent également quelques commentaires.

La courbe de la figure 9, représentative des variations des poids de protéides précipités de 100 cm³ de sérum d'Homme par le sulfate d'ammonium en fonction de la concentration en ce sel, ne montre pas l'existence d'un palier, comme nous l'avions constaté pour le sérum de Cheval.

La précipitation des protéides commence lorsque la saturation en sulfate d'ammonium atteint le taux de 0,25 (*) et augmente continuellement jusqu'à ce que le taux atteigne environ 0,75..

A ce moment, la presque totalité des protéides a été précipitée. Ce résultat est conforme à ceux de Mme Roche, Dorier et Samuel [159].

Remarquons ici encore que les lipides suivent les pro-

(*) Mme Roche, Dorier et Samuel [159] signalent que dans le sérum humain la précipitation de protéides ne commence qu'au taux de 0,30.

téides dans leur précipitation et la courbe de la figure 10, représentative des variations de poids de substances lipoïdiques précipitées en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium, suit à peu près parallèlement celle des protéides auxquels ces lipides sont fixés.

Conclusions du chapitre premier de la troisième partie

Dans ce premier chapitre, nous avons étudié en détail la précipitation des protéides sériques par le sulfate d'ammonium, en considérant non seulement les protéides totaux, mais encore les protéides insolubles et solubles dans l'eau pure.

Les recherches que nous avons effectuées sur le sérum de Cheval nous permettent d'émettre les conclusions suivantes :

1° Au voisinage de la demi-saturation en sulfate d'ammonium, il existe bien, comme l'avait remarqué Hofmeister, un large palier qui sépare deux fractions protéidiques (globulines et albumines).

2° Il est également vrai, comme l'ont remarqué Fuld, Porges et Spiro, que le sulfate d'ammonium au tiers de saturation précipite la totalité des euglobulines. Mais le précipité obtenu dans ces conditions est loin d'être constitué uniquement par des euglobulines; il contient, en effet, une très abondante proportion de pseudoglobulines.

3° La fraction qui précipite entre le tiers et la demi-saturation en sulfate d'ammonium est bien constituée par des pseudoglobulines, mais elle ne représente qu'une faible portion de cette fraction [195].

Les essais que nous avons entrepris sur le sérum d'Homme ne nous ont pas montré l'existence d'un palier net dans la courbe de précipitation des protéides par le sulfate d'ammonium, comme on le remarque pour le sérum de Cheval.

Dans tous les cas, nous avons enfin constaté que les

lipides sériques suivaient dans leur précipitation les protéides auxquels ils sont fixés.

Quelle que soit la concentration exacte en sulfate d'ammonium à laquelle corresponde le palier, peut-on conclure que lorsque cette concentration a été atteinte, toutes les globulines ont été précipitées et toutes les albumines sont restées en solution ?

Autrement dit, le fait de considérer les globulines comme des protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation et les albumines comme les protéides solubles dans ces conditions, est-il justifié ?

Ce sont les questions auxquelles nous allons nous efforcer de répondre dans le second chapitre de notre étude expérimentale.

CHAPITRE II

La solubilité dans les solutions salines constitue-t-elle un caractère suffisant pour définir les globulines et les albumines ?

Aussi longtemps que les chercheurs n'eurent à leur disposition que l'analyse élémentaire et le dosage des aminoacides — auquel il serait imprudent d'accorder une valeur trop absolue [201] —, il a été fort difficile d'établir une distinction entre les globulines et les albumines, les résultats trouvés pour ces deux fractions étant très comparables.

Aussi, la plupart des auteurs anciens, dont il est fait mention dans notre étude historique, se contentaient-ils de distinguer ces deux variétés de protéides par leur solubilité. On sait aujourd'hui combien cette propriété est infidèle et insuffisante à définir un protéide; de plus, des fractions très voisines et constituées par des protéides identiques peuvent avoir des solubilités très différentes (Machebœuf et Tayeau [115]).

Mais maintenant que nous avons à notre disposition des constantes physiques très fidèles, telles que le poids moléculaire, la pression osmotique, le point isoélectrique, la viscosité, la tension superficielle, etc., la comparaison entre les deux fractions protéidiques du sérum, séparées par les sels, mérite d'être reprise. Elle doit nous permettre de répondre à la question que nous nous sommes posée au début de ce chapitre : la solubilité dans les solutions salines constitue-t-elle un caractère suffisant pour définir les globulines et les albumines ?

Un certain nombre d'auteurs se sont déjà attaqués à la résolution de ce problème : parmi eux, citons Mac Farlane [100], Mme Roche et ses collaborateurs [159], Ogston [130], Hewitt [70], Kekwick [85], Svensson [184], etc., dont les conclusions ont déjà permis de dissiper quelque peu le voile épais qui plane encore sur le grand problème du fractionnement des protéides sériques.

Parmi les nombreuses constantes physiques susceptibles de caractériser les protéides, il convient de faire une mention toute particulière au point isoionique, sur lequel nous avons donné un bref aperçu dans la seconde partie de notre travail.

C'est donc en nous basant sur cette importante notion que nous avons tenté de résoudre le problème du fractionnement des protéides sériques par le sulfate d'ammonium.

A cette fin, nous avons déterminé le point isoionique d'un certain nombre de fractions obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium entre diverses concentrations.

Ici encore, nos essais ont porté sur le sérum de Cheval et sur le sérum d'Homme.

I. — Essais sur le sérum de Cheval

Nous disposons d'un volume de 250 cm^3 de sérum de Cheval.

Désirant recueillir la fraction qui précipite à une concentration en sulfate d'ammonium correspondant au titre de 0,3, la saturation étant prise pour unité, nous ajoutons peu à peu au sérum, en appliquant la formule notée plus haut (p. 40), un volume de 107,1 cm^3 de solution saturée de sulfate d'ammonium. Après avoir agité et attendu un quart d'heure, l'ensemble est soumis à la filtration en glacière. On recueille ainsi un précipité (fraction A). Le filtrat, qui mesure un volume de 290 cm^3 et dont la saturation en sulfate d'ammonium est de 0,3, est additionné de 48,3 cm^3

de solution saturée de sulfate d'ammonium, afin que le titre de la solution atteigne le taux de 0,4 (*).

Un nouveau précipité apparaît, il est recueilli par filtration (fraction B).

Au filtrat (275 cm³), nous ajoutons 55 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium; l'ensemble (0,5 saturé en ce sel) est soumis à la filtration; le précipité ainsi recueilli constitue la fraction C.

Le filtrat, qui mesure un volume de 257 cm³, reçoit 64,2 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium (nouveau titre 0,60); un précipité apparaît, il est recueilli par filtration (fraction D).

On obtient encore un filtrat (285 cm³) dont le titre en sulfate d'ammonium sera de 0,7, lorsqu'il aura reçu 95 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité formé est recueilli par filtration (fraction E).

Le filtrat obtenu est enfin additionné de sulfate d'ammonium en poudre jusqu'à ce que le liquide soit complètement saturé en ce sel. Il se forme un dernier précipité (**) que l'on recueille (fraction F).

Le tableau schématique ci-contre résume le fractionnement que nous venons d'effectuer.

Chaque précipité est dissous dans quelques centimètres cubes d'eau distillée et chaque solution ainsi obtenue est traitée suivant la technique indiquée dans la seconde partie de notre travail en vue de la détermination de son point

---

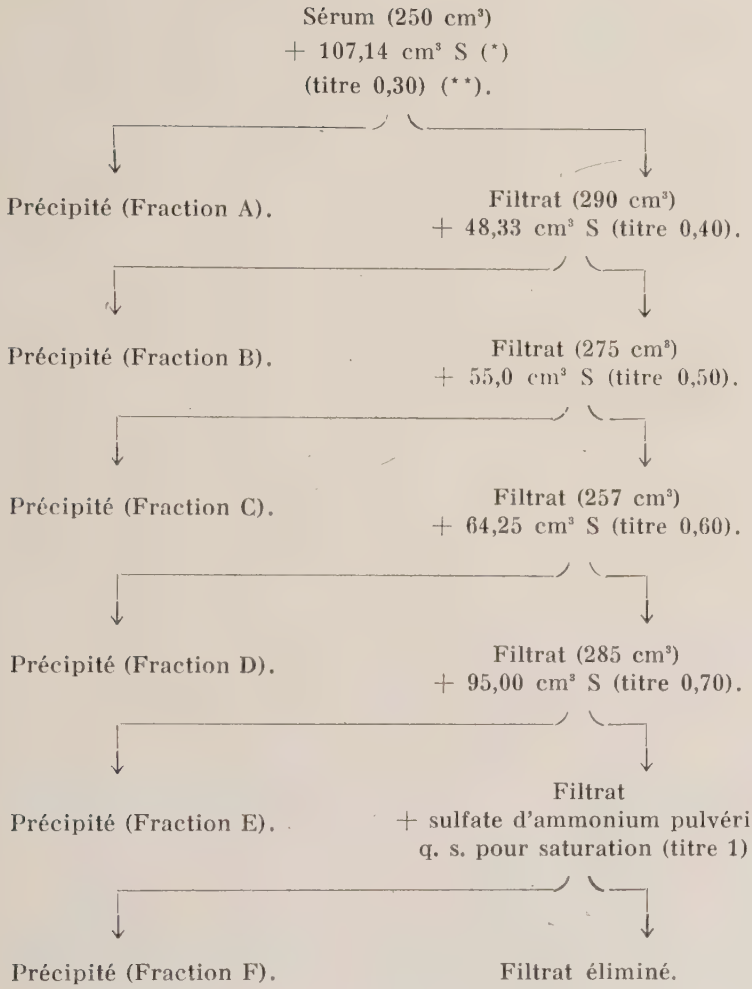
(*) Si l'on veut connaître le volume de solution saturée de sulfate d'ammonium que l'on doit ajouter à une solution S contenant déjà une certaine quantité de ce sel afin d'obtenir un nouveau titre en sulfate d'ammonium, on peut appliquer la formule suivante :

$$x = \frac{V\ (T' - T)}{1 - T'}$$

dans laquelle :

T = titre en sulfate d'ammonium de la solution S;
x = volume de solution saturée de sulfate d'ammonium à ajouter;
T' = titre désiré en sulfate d'ammonium;
V = volume de la solution S traitée.

(**) On vérifie à l'aide d'acide trichloracétique que le filtrat ne contient plus de protéides.



isoionique. Elle est donc placée dans un dialyseur plongeant dans une solution de sulfate de sodium à 1 p. 100 (en présence de traces de toluène [177]). Tous les jours, la solution extérieure est renouvelée. Après trois jours, la solution saline est remplacée par de l'eau distillée que l'on renou-

(*) S = solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée.
(**) La saturation est prise pour unité.

velle plusieurs fois par jour (pendant quatre jours) jusqu'à disparition complète des ions SO_4—— [135, 150, 137]. A la fin de l'opération, le contenu des dialyseurs présente l'aspect suivant :

Fractions A, B, C : abondant précipité et liquide clair surnageant;

Fractions D, E, F : liquide limpide.

TABLEAU IV

FRACTION	CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM (La saturation est prise pour unité)	POINT ISOIONIQUE
A	Entre 0 et 0,30	6,00
B	— 0,30 et 0,40	5,91
C	— 0,40 et 0,50	5,31
D	— 0,50 et 0,60	5,22
E	— 0,60 et 0,70	5,41
F	— 0,70 et 1,00	4,71

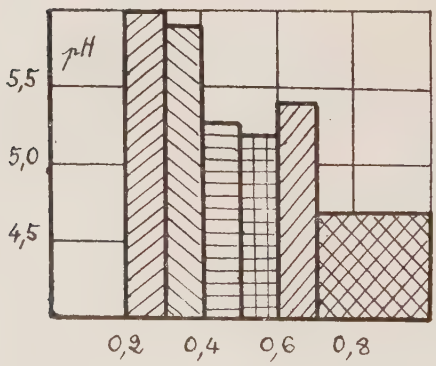


Fig. 11.

Chaque fraction est traitée suivant le mode opératoire décrit par Sandor [167] (voir p. 32) en vue de la détermination des points isoioniques.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau IV, auquel correspond le schéma de la figure 11.

Avant d'interpréter nos résultats, nous rapporterons l'une des expériences que nous avons effectuées sur le sérum d'Homme.

II. — Essais sur le sérum d'Homme

Grâce à une saignée effectuée sur un malade, nous avons pu disposer d'un volume de 100 cm³ de sérum humain.

En utilisant les formules précédemment exposées, nous avons effectué divers mélanges de sérum et de solution saturée en sulfate d'ammonium, mais, cette fois, chaque fraction protéidique obtenue a été redissoute, puis précipitée de nouveau (purification).

Mélange n° 1. — 100 cm³ de sérum sont additionnés de 42,8 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium (titre : 0,3 saturé en $SO_4(NH_4)_2$). On mélange et, après dix minutes de contact, on centrifuge. Le précipité recueilli est redissous dans 5 cm³ d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée de 2,1 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium (titre 0,3). On attend dix minutes et on centrifuge. Le précipité obtenu est recueilli, il est dissous dans quelques centimètres cubes d'eau distillée. La solution ainsi obtenue constitue la fraction A.

Mélange n° 2. — Les deux eaux-mères de centrifugation, qui mesurent un volume de 146 cm³ (0,3 saturé en sulfate d'ammonium), sont traitées par 24,3 cm³ de la solution de sulfate d'ammonium (titre 0,4). Après centrifugation, le précipité est recueilli et redissous dans 5 cm³ d'eau. A la solution obtenue, on ajoute 3,3 cm³ de solution de sulfate d'ammonium (titre 0,4). Après centrifugation, on obtient un précipité qui, redissous dans quelques centimètres cubes d'eau, constitue la fraction B.

Mélange n° 3. — Les eaux-mères, qui mesurent un volume de 174 cm³, sont additionnées de 34,8 cm³ de solution de sulfate d'ammonium (titre 0,5). Le précipité formé est redissous dans 2,5 cm³ d'eau et la solution obtenue est traitée par 2,5 cm³ de solution de sulfate d'ammonium. Le précipité formé, redissous dans quelques centimètres cubes d'eau, constitue la fraction C.

Mélange n° 4. — Les eaux-mères précédentes, mesurant un volume de 210 cm³, sont traitées par 52,5 cm³ de solution de sulfate d'ammonium (titre 0,6). On obtient un précipité peu abondant qui, pour cette raison, ne sera pas purifié. Redissous dans un peu d'eau, il constitue la fraction D.

Mélange n° 5. — Les eaux-mères obtenues précédemment ont un volume de 234 cm³; additionnées de 78 cm³ de solution de sulfate d'ammonium (titre 0,70), elles laissent précipiter une fraction qui, purifiée comme précédemment puis dissoute dans un peu d'eau, constitue la fraction E.

Mélange n° 6. — Enfin, les eaux-mères précédentes sont additionnées d'acide sulfurique N jusqu'à pH 3,9. Dans ces conditions, tout le reste des protéides précipite (comme cela se produit lorsque la saturation en sulfate d'ammonium est complète : 1). Les protéides redissous dans un peu d'eau très légèrement ammoniacale constituent la fraction F.

Le tableau ci-contre schématise les opérations que nous venons d'effectuer.

Chaque fraction est portée à la dialyse en glacière, d'abord contre une solution de sulfate de sodium à 1 p. 100, puis contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée, selon la technique décrite par Sandor [167].

A la fin de l'opération, les fractions A, B et C ont laissé

TABLEAU V

FRACTION	CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM (La saturation est prise pour unité)	POINT ISOIONIQUE
A	Entre 0 et 0,30	6,10
B	— 0,30 et 0,40	5,79
C	— 0,40 et 0,50	5,53
D	— 0,50 et 0,60	5,47
E	— 0,60 et 0,70	5,46
F	— 0,70 et 1,00	5,02

Sérum : 100 cm³
+ 42,85 cm³ S (*).

↓ Précipité
redissous dans 5 cm³ d'eau
+ 2,14 cm³ S (titre 0,3) (**).

↓ Précipité redissous (Fraction A).

↓ Solutions-mères (146 cm³)
+ 24,33 cm³ S.

↓ Précipité
redissous dans 5 cm³ d'eau
+ 3,33 cm³ S (titre 0,4)

↓ Précipité redissous (Fraction B).

↓ Solutions-mères (174 cm³)
+ 34,8 cm³ S.

↓ Précipité
redissous dans 2,5 cm³ d'eau
+ 2,5 cm³ S (titre 0,5)

↓ Précipité redissous (Fraction C).

↓ Solutions-mères (210 cm³)
+ 52,5 cm³ S.

↓ Précipité redissous (Fraction D) (titre 0,6).

↓ Solutions-mères (234 cm³)
+ 78 cm³ S.

↓ Précipité
redissous dans 5 cm³ d'eau
+ 11,6 cm³ S (titre 0,7).

↓ Précipité redissous (Fraction E).

↓ Solutions-mères (268 cm³)
+ SO_4H_2 N, q. s. pour pH 3,9.

↓ Précipité redissous (Fraction F).

↓ Eaux-mères éliminées.

(*) S = solution saturée en sulfate d'ammonium et neutralisée.
(**) La saturation est prise pour unité.

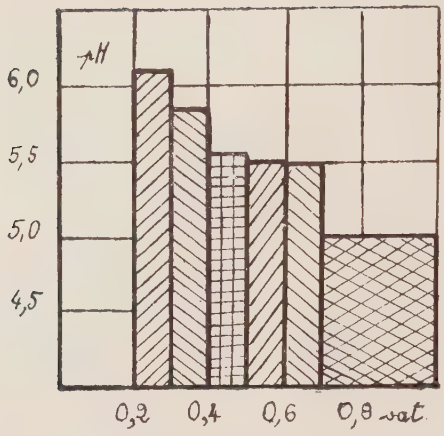


Fig. 12.

précipiter des euglobulines. Pour chaque fraction, on détermine, en utilisant la méthode de Sandor, le point isoionique (voir p. 32).

Les résultats que nous avons obtenus dans cette expérience sont rassemblés dans le tableau V auquel correspond le schéma de la figure 12.

Interprétation

Les résultats obtenus dans nos deux expériences permettent de conclure que la fraction « globulines » et la fraction « albumines » obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium à demi-saturation ne constituent pas des fractions homogènes.

Si la séparation effectuée par ce sel s'était montrée parfaite, les fractions obtenues pour une concentration en sulfate d'ammonium inférieure à la demi-saturation auraient eu le même point isoionique, celui de la sérum-globuline, c'est-à-dire 6 environ, tandis que toutes les fractions obtenues après élimination des précédentes auraient présenté des pH isoioniques identiques, celui de la sérum-albumine, c'est-à-dire 4,9. Or, il n'en est rien.

1° L'examen de nos résultats concernant les protéides insolubilisés pour des concentrations en sulfate d'ammonium inférieures à la demi-saturation nous permet d'observer que les fractions précipitées présentent des points isoioniques de plus en plus bas au fur et à mesure qu'augmente la concentration en sulfate d'ammonium. Ceci nous oblige à admettre que les « globulines » obtenues par

le sulfate d'ammonium à demi-saturation contiennent des albumines.

Ce résultat est tout à fait conforme aux recherches de Mac Farlane [100] qui, ayant étudié à l'ultracentrifugeuse les diverses fractions obtenues à partir du sérum, a montré que les globulines obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium à demi-saturation étaient hétérogènes et que cette hétérogénéité était due surtout à la présence d'albumines.

2° Les diverses fractions protéidiques solubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé et considérées généralement comme des albumines présentent, elles aussi, des points isoioniques de plus en plus bas au fur et à mesure qu'augmente la concentration en sulfate d'ammonium. Ces points sont compris entre pH 5,47 et 5,02 pour le sérum humain et entre 5,22 et 4,71 pour le sérum de Cheval (*).

Ce résultat nous oblige à admettre que la fraction « albumine » définie comme soluble dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation contient des globulines.

Cette conclusion doit être rapprochée des travaux de Hewitt [70], qui a montré que la sérum-albumine obtenue à l'aide du sulfate d'ammonium était souillée par la présence de globulines. Au cours d'une fort belle étude sur la solubilité des protéides, Pérez [136] est parvenu à une conclusion absolument identique (**).

Conclusions du chapitre II de la troisième partie

Les fractions protéidiques obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium selon Hofmeister et ainsi définies :

1° *Globulines :* protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé;

(*) On sait que la fraction « albumine » des sérums présente également, suivant les espèces, des points isoélectriques variant de 4 à 6 [90].

(**) Signalons que, dans une très intéressante communication, Mme Roche, Samuel et Arthaud [161] ont montré que si, dans une solution protéidique, la concentration en protéides était supérieure à 1 p. 100, le sulfate d'ammonium provoquait la précipitation de certaines fractions qui, en solution diluée, n'auraient pas précipité.

2° *Albumines :* protéides solubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé,
ne constituent pas des fractions homogènes. Les « globulines » ainsi obtenues contiennent des albumines.

Quant aux « albumines », elles sont souillées par la présence de globulines.

Les albumines qui souillent ainsi la fraction globulines et les globulines qui souillent la fraction albumines sont-elles en quantité appréciable ?

C'est la question que nous nous sommes posée et à laquelle nous allons essayer de répondre dans le chapitre III de notre partie expérimentale.

CHAPITRE III

Point isoionique des mélanges de globulines et d'albumines

Dans le précédent chapitre, nous avons montré que les fractions « globulines » et « albumines » obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium étaient hétérogènes. La fraction « albumine » contient, en effet, des globulines et la fraction « globulines » est souillée par la présence d'albumines.

Les albumines qui suivent les globulines dans leur précipitation sont-elles abondantes ?

Les globulines qui souillent les albumines se trouvent-elles dans cette fraction en quantité appréciable ?

Afin de pouvoir répondre à ces questions, nous avons tout d'abord commencé par préparer à partir d'un sérum de Cheval des globulines purifiées (voir p. 35) et des albumines cristallisées (voir p. 35) et nous les avons mélangées dans des proportions variées; nous avons ensuite mesuré le point isoionique des divers mélanges.

Nos solutions de globulines purifiées et d'albumines cristallisées, amenées au même titre en protéides, contenaient 28,38 grammes de protéides par litre.

Nous avons effectué les mélanges suivants :

N° 1 : 0 cm³ de sol. de globulines + 10 cm³ de sol. d'albumines.
N° 2 : 2 cm³ — — + 8 cm³ — —
N° 3 : 3 cm³ — — + 7 cm³ — —
N° 4 : 7 cm³ — — + 3 cm³ — —
N° 5 : 9 cm³ — — + 1 cm³ — —
N° 6 : 10 cm³ — — + 0 cm³ — —

Voici leurs points isoioniques (tableau VI) mesurés par la technique de SANDOR [167].

TABLEAU VI

NUMÉRO	GLOBULINES (p. 100 du mélange)	ALBUMINES (p. 100 du mélange)	pH ISOIONIQUE
1	0	100	4,93
2	20	80	5,03
3	30	70	5,25
4	70	30	5,58
5	90	10	5,89
6	100	0	6,11

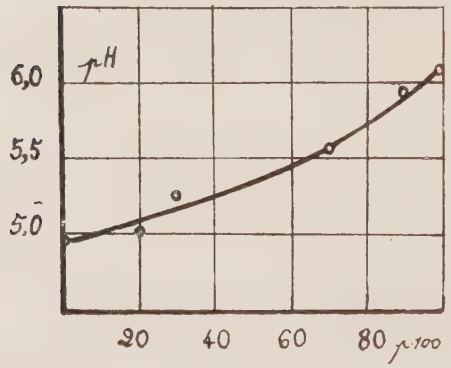


FIG. 13.

Courbe représentative des variations du pH isoionique d'un mélange globulines purifiées-albumines cristallisées en fonction de la quantité (p. 100) de globulines contenues dans le mélange.

Au tableau VI correspond la courbe de la figure 13 représentative des variations du pH isoionique d'un mélange sérum-albumines - sérum-globulines en fonction de la quantité (p. 100) de globulines contenues dans le mélange.

Nous inspirant de ces résultats, puis de ceux exposés au chapitre premier et au chapitre II, il nous est possible, en effectuant quelques extrapolations, d'établir deux tableaux (tableaux VII et VIII), rassemblant, pour le sérum de Cheval et pour le sérum d'Homme, les fractions précipitées entre diverses concentrations en sulfate d'ammonium, avec leur point isoionique et leur composition.

TABLEAU VII

Sérum de Cheval			
CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM	POIDS DE CHAQUE FRACTION (G.)	pH ISOIONIQUE DE CES FRACTIONS	COMPOSITION
De 0 à 0,30	1,60	6,00	Globulines pures
— 0,30 à 0,40	0,91	5,91	Globulines pures
— 0,40 à 0,50	1,97	5,31	45 p. 100 globulines 55 p. 100 albumines
— 0,50 à 0,60	Traces	5,22	60 p. 100 albumines 40 p. 100 globulines
— 0,60 à 0,70	Traces	5,41	50 p. 100 albumines 50 p. 100 globulines
— 0,70 à 1,00	1,31	4,71	Albumines pures

TABLEAU VIII

Sérum d'Homme			
CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM	POIDS DE CHAQUE FRACTION (G.)	pH ISOIONIQUE DE CES FRACTIONS	COMPOSITION
De 0 à 0,30	0,80	6,10	Globulines pures
— 0,30 à 0,40	1,40	5,79	95 p. 100 globulines 5 p. 100 albumines
— 0,40 à 0,50	1,30	5,53	82 p. 100 globulines 18 p. 100 albumines
— 0,50 à 0,60	1,00	5,47	35 p. 100 albumines 65 p. 100 globulines
— 0,60 à 0,70	1,70	5,46	40 p. 100 albumines 60 p. 100 globulines
— 0,70 à 1,00	1,00	5,02	Albumines pures

Connaissant maintenant l'abondance de chaque fraction et sa compositon en protéides, il est facile désormais de déterminer approximativement la proportion d'impuretés contenues dans les fractions protéidiques insolubles, puis solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Voici nos résultats :

a) *Sérum de Cheval :*

1° Composition des protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé :

Globulines : 76 p. 100. Albumines : 24 p. 100.

2° Composition des protéides solubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé :

Albumines : 95 p. 100. Globulines : 5 p. 100 (*).

b) *Sérum d'Homme :*

1° Composition des protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé :

Globulines : 92 p. 100. Albumines : 8 p. 100.

2° Composition des protéides solubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé :

Albumines : 56 p. 100. Globulines : 44 p. 100 (*).

Ces chiffres montrent que, pour le sérum d'Homme en particulier, le sulfate d'ammonium à demi-saturation et à pH 7 ne permet qu'une séparation très incomplète des deux grandes fractions protéidiques. D'après nos résultats, la fraction albumine contiendrait plus de 40 p. 100 d'impuretés.

(*) Il importe d'insister sur le fait que ces chiffres sont seulement destinés à donner une idée de l'ordre de grandeur des impuretés. Les variations dans les points isoioniques des protéides sériques d'une même espèce peuvent être fort importantes. De plus, d'autres facteurs (dénaturation, vieillissement...) peuvent venir apporter des perturbations à ces pH. En conséquence, on ne saurait accorder une valeur absolue à ces résultats.

En utilisant une méthode très différente de la nôtre, Mme Roche [155] est parvenue à une conclusion identique et fait remarquer que dans le sérum humain, la précipitation des globulines est loin d'être complète lorsque la solution atteint le taux de la demi-saturation en sulfate d'ammonium; elle conseille d'atteindre le taux de saturation de 0,6. Il convient, en effet, de remarquer que la fraction albuminique qui précipite entre les saturations de 0,5 et 0,6 est de loin la plus riche en globulines. On peut encore, si l'on veut, effectuer la précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, mais alors le pH du milieu ne devra pas être celui du sérum, mais atteindre 5,7 (Mme Roche, Samuel et Arthaud [161]).

Conclusions du chapitre III de la troisième partie

Après avoir étudié le pH isoionique de divers mélanges globulines-albumines purifiées, nous avons cherché à préciser l'abondance des impuretés contenues dans les fractions protéidiques obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Ce résultat précise la conclusion que nous avons émise à la fin du chapitre précédent.

Les « globulines » obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium demi-saturé contiennent des albumines.

Les « albumines » solubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé sont souillées par la présence de globulines.

Pour émettre cette conclusion, nous avions montré que si, à l'aide du sulfate d'ammonium, on fractionne chacun de ces protéides, on obtient des précipités protéidiques présentant des points isoioniques différents.

La différence entre les points isoioniques ne pourrait-elle pas avoir une autre cause que la présence de protéides hétérogènes ? Certains lipides fixés aux protéides n'ont-ils pas la propriété d'apporter des modifications importantes

dans le point isoionique des protéides ? (Machebœuf et Januskiewicz [107]).

Avant donc de pouvoir conclure avec certitude à l'hétérogénéité des fractions obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium, il faut tout d'abord répondre à ces questions. C'est ce que nous avons essayé de faire dans le chapitre IV de notre partie expérimentale.

CHAPITRE IV

Rôle des lipides dans la précipitation des fractions protéidiques du sérum par le sulfate d'ammonium.

Les fractions protéidiques que l'on extrait du sérum sanguin et des divers tissus ne sont pas constitués par des protéides purs; elles contiennent d'autres substances : des glucides (Pfluger [138], Sœrensen et Haugaard [179], Przylecki [151]), et surtout des lipides (Miescher [124], Biedermann [17], Ciaccio [37], Hardy [66], Haslam [67], Chick [36]).

Les substances lipoïdiques fixées aux protéides sont constituées par des glycérides, des phosphatides, des stérides et des stérols, substances insolubles dans l'eau, rendues stables en phase aqueuse grâce aux liaisons qui les unissent aux protéides pour former les cénapses lipido-protéidiques (Machebœuf [104, 101]).

La nature des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin a fait l'objet d'un certain nombre de recherches (Machebœuf et Sandor [108, 109], Machebœuf et Tayeau [110, 111, 114, 115], Delage [40], Tayeau [185, 186, 187, 188, 189, 190]).

La présence de ces lipides dans les diverses fractions protéidiques apporte-t-elle des modifications dans les propriétés des protéides ?

Dans certaines fractions particulièrement riches en lipides (Machebœuf [101]), on observe d'importantes modifications : c'est ainsi que les cénapses acidoprécipitables du sérum sanguin, qui sont très riches en lipides, possèdent un point isoionique très différent de celui des protéides qui

les constituent (Machebœuf et Januskiewicz [107], Machebœuf et Duboy [106]). On sait aujourd'hui que ces modifications sont apportées par les groupements ionisables appartenant aux molécules de phosphoaminolipides adsorbés sur les protéides (Tayeau [194]).

Les lipides sont donc susceptibles de modifier le point isoionique des protéides auxquels ils sont fixés. S'il en est ainsi, les variations que nous avons constatées dans le point isoionique des diverses fractions protéidiques du sérum ne pourraient-elles pas être dues aux lipides contenues dans ces fractions ?

Pour répondre à cette question, nous avons préparé, à partir d'un sérum de Cheval, diverses fractions protéidiques, en utilisant le mode opératoire exposé dans le chapitre II de notre étude expérimentale.

Chacune des fractions protéidiques obtenue a été divisée en deux parts. Sur la première de ces parts, nous avons effectué une détermination de point isoionique. La seconde de ces parts a été délipidée par la technique de Saias (voir p. 36) et, sur les protéides ainsi délipidés, nous avons effectué une détermination de point isoionique.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau IX.

TABLEAU IX

CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM (*)	POINT ISOIONIQUE DE LA FRACTION BRUTE	POINT ISOIONIQUE DE LA FRACTION
Entre 0 et 0,30	6,15	6,00
— 0,30 et 0,40	5,90	5,90
— 0,40 et 0,50	5,45	5,35
— 0,50 et 0,70	5,40	5,40

(*) La saturation est prise pour unité.

Nos résultats permettent de conclure que les modifications que nous avons observées dans le point isoionique des diverses fractions protéidiques que nous avons préparées, ne sont pas dues aux substances lipoïdiques adsorbées sur les protéides.

La quantité de lipides contenue dans ces fractions est en effet trop faible (4 p. 100 environ par rapport aux protéides) pour apporter des modifications notables dans le point isoionique des protéides; il n'en est pas de même lorsque l'on considère certaines fractions — peu abondantes d'ailleurs — comme par exemple les cénapses acidoprécipitables qui contiennent 30 à 40 p. 100 de lipides.

Cette conclusion mérite d'être rapprochée de celles d'Ohlson et Rundsquist [131] et de Sandor [165], qui ont montré que la délipidation des protéides n'apportait pas de modification dans la détermination du rapport albumines/globulines et, par conséquent, dans la solubilité des protéides du sérum sanguin (*).

Conclusions du chapitre IV de la troisième partie

En utilisant la technique de Saias, qui permet la délipidation des fractions protéidiques du sérum sans dénaturer les protéides, nous avons montré que les points isoioniques des diverses fractions protéidiques du sérum que nous avons préparées sont fort peu influencés par les lipides qu'elles contiennent.

Les conclusions que nous avons émises dans le chapitre II conservent donc toute leur valeur.

(*) Notons que Boutroux [27] a signalé que la précipitation par le sulfate d'ammonium des protéides délipidés commençait plus tôt (quart de saturation) qu'avec des protéides non délipidés (tiers de saturation).

CHAPITRE V

Quelques résultats pratiques (*)

Malgré ses nombreuses imperfections, la technique utilisant le sulfate d'ammonium, dans la séparation des deux grandes fractions protéidiques du sérum sanguin, reste la plus usitée en clinique.

En dépit des nombreuses recherches effectuées depuis quelques années, et dont nous avons fait mention précédemment, on continue en pratique à considérer comme étant des globulines les protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation et des albumines les protéides solubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé (**).

Dans ces conditions, « le rapport albumines/globulines (***) ne saurait avoir d'autre signification que celle d'un indice et non la valeur absolue qui lui est en général attribuée » [155].

Pour ce rapport, des valeurs très variées ont été indiquées : 1 selon certains auteurs [105, 159]; 1,5 [39, 148], selon d'autres.

Quelle est sa réelle valeur ?

Pour répondre à cette question, nous avons effectué des essais, principalement sur le sérum d'Homme normal. Nous avons pris soin dans nos déterminations de traiter chaque fraction protéidique à l'alcool, puis à l'éther (voir p. 35),

---

(*) Les résultats exposés dans ce chapitre ont déjà fait l'objet d'une note [129] et d'un mémoire [121] en collaboration avec E. Neuzil.

(**) On utilise une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7).

(***) La sérum-albumine ou albumine est souvent appelée improprement sérine par les cliniciens. Rappelons que la sérine est un acide aminé alcoolique : $CH_2OH - CHNH_2 - COOH$, et non un protéide.

afin de ne pas compter parmi les protéides des lipides et autres substances adsorbés sur eux (*).

Avant de rapporter nos résultats, mentionnons que chez le Cheval, le rapport A/G est généralement compris entre 0,6 et 1 (Sandor [165]) (**).

Nos essais sur le sérum humain ont porté sur des jeunes gens de vingt à vingt-cinq ans, jouissant tous d'une parfaite santé (***), corroborée d'ailleurs par certaines analyses effectuées sur leur sang (glucides, chlore, volume globulaire, lipides, extrait sec et numérations globulaires [****]).

Dans le tableau X sont rassemblés nos résultats.

Remarquons tout d'abord que le rapport albumines/globulines n'a pas du tout la même valeur chez le Cheval et chez l'Homme.

Ce résultat est conforme aux recherches de Derivaux [43] qui a montré que le rapport A/G était bien inférieur chez le Cheval que chez l'Homme.

Chez l'Homme normal, le rapport albumines/globulines est généralement compris entre 1,5 et 1,8 (*****). Dans certaines maladies, il s'abaisse considérablement : dans la cirrhose atrophique et surtout dans la néphrose lipoïdique où il atteint des taux très bas [113, 116]. Au cours de certains états, par contre, il augmente de valeur (Bentégeat [15]).

(*) Nos dosages ont été effectués selon la technique décrite page 35.

(**) L'auteur cité ici a utilisé également la solution de sulfate d'ammonium saturée et neutralisée.

(***) Il importe de faire remarquer que certains auteurs [113, 116, 91] ont trouvé pour le rapport A/G des valeurs inférieures aux nôtres. Nous avons cependant utilisé la même technique que ces auteurs. Peut être ce fait doit-il être imputé aux restrictions alimentaires. Mentionnons néanmoins que les jeunes gens sur le sérum desquels nous avons pratiqué nos dosages semblaient avoir été fort peu soumis aux restrictions.

(****) Dosage des protéides par la méthode de Machebœuf, dosage du glucose par la technique de Baudoin-Lewin, dosage du chlore par la méthode de Denigès-Laudat. Détermination du volume globulaire par sédimentation. Dosage de l'extrait sec par dessiccation à l'étuve. Numération globulaire au compte globules de Malassez. Pour le dosage des albumines et des globulines, voir page 34.

(*****) Si l'on sépare les albumines des globulines en utilisant l'électrophorèse, on arrive à des rapports A/G compris également entre 1,5 et 1,8 [85].

TABLEAU X

NOMS	GLOBULINES (G. PAR LITRE)	ALBUMINES (G. PAR LITRE)	RAPPORT ALBUMINES / GLOBULINES	SUBSTANCES LIPOÏDIQUES (G. PAR LITRE) SUR GLOBULINES	SUBSTANCES LIPOÏDIQUES (G. PAR LITRE) SUR ALBUMINES	EXTRAIT SEC (P. 100)	NUMÉRATION GLOBULAIRE (PAR MM³)	VOLUME GLOBULAIRE (P. 100)	CL TOTAL (G. PAR LITRE)	CL PLASMATIQUE (G. PAR LITRE)	GLYCÉMIE (*) SANG TOTAL (G. PAR LITRE)
Ch.	**24,38**	**58,18**	**2,38**	3,07	4,09	»	5.161.000	49,50	2,85	3,76	0,65
La.	**33,06**	**51,93**	**1,57**	2,44	3,42	21,90	4.662.000	49,27	2,79	3,76	1,02
Le.	**32,20**	**52,88**	**1,64**	5,24	7,28	23,49	5.058.000	52,46	2,82	3,82	0,88
Mi.	**30,51**	**55,36**	**1,81**	2,91	4,70	22,39	4.938.000	48,83	2,70	»	0,74
Pi.	**35,68**	**57,62**	**1,61**	»	»	20,40	4.467.000	46,92	2,85	3,85	0,87
Bo.	**38,64**	**65,60**	**1,69**	2,88	4,74	24,02	4.920.000	49,10	2,73	3,76	0,87
Qu.	**37,85**	**59,20**	**1,56**	3,36	5,26	22,44	4.191.000	45,90	2,85	3,88	0,83
Go.	**36,62**	**61,60**	**1,68**	2,54	3,18	22,90	4.935.000	47,70	2,78	3,79	0,78
Mo.	**27,22**	**54,52**	**2,00**	2,88	3,56	22,04	4.895.000	45,09	2,91	3,82	0,86
Ra.	**27,75**	**51,02**	**1,83**	2,80	2,52	22,20	4.362.000	50,00	2,85	3,64	0,75
Mon.	**33,62**	**65,47**	**1,94**	2,32	3,80	24,05	4.806.000	48,46	2,85	3,79	0,87
X.	**44,12**	**53,96**	**1,22**	3,14	2,70	23,77	4.344.000	51,90	2,73	3,76	»

(*) Les chiffres concernant la glycémie se montrent relativement faibles, car nos prises de sang ont été effectuées le matin, alors que nos sujets étaient à jeun.

Conclusions du chapitre V de la troisième partie

Si, comme on le fait habituellement en clinique, on considère comme « globulines » les protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé et comme « albumines » les protéides solubles dans ces conditions (*), le rapport albumines/globulines a une valeur de 1 environ chez le Cheval. Chez l'Homme normal, il est compris entre 1,5 et 1,8.

(*) Le sérum ne subissant pas de dilution préalable.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Après avoir passé en revue les nombreuses méthodes proposées pour la séparation des protéides sériques, nous avons effectué une étude systématique sur le fractionnement de ces protéides par le sulfate d'ammonium.

Nous avons tout d'abord étudié la courbe de précipitation des protéides du sérum en fonction de la concentration saline, en envisageant non seulement les protéides totaux, mais encore les protéides solubles et insolubles dans l'eau pure. Les expériences que nous avons effectuées sur le sérum de Cheval, puis sur le sérum d'Homme nous ont permis d'émettre les conclusions suivantes :

Au voisinage de la demi-saturation en sulfate d'ammonium, il existe bien pour le sérum de Cheval, comme l'avait signalé jadis Hofmeister, un palier qui sépare deux fractions protéidiques (considérées habituellement comme étant les globulines et les albumines). Ce palier, très net pour le sérum de Cheval, n'existe pas pour le sérum humain.

Le sulfate d'ammonium au tiers de saturation précipite la totalité des euglobulines, mais le précipité obtenu n'est pas seulement constitué par ces protéides, comme l'ont signalé Porges, Fuld et Spiro; il contient, en outre, une très abondante quantité de pseudoglobulines.

La fraction qui précipite entre le tiers et la demi-saturation en sulfate d'ammonium est bien constituée par

des pseudoglobulines, mais elle ne représente seulement qu'une faible partie de cette fraction.

Doit-on admettre, comme Hofmeister, que la fraction insolubilisée, lorsque la concentration en sulfate d'ammonium atteint le taux de la demi-saturation, est constituée par des globulines et que la fraction soluble dans ces conditions représente les albumines ? Nous avons cherché à répondre à cette question. Pour cela, nous avons déterminé le point isoionique des fractions protéidiques précipitant entre diverses concentrations en sulfate d'ammonium. Nos essais nous ont permis de conclure que, dans le sérum de Cheval comme dans le sérum d'Homme, les fractions « globulines » et « albumines », définies selon Hofmeister, sont hétérogènes. Les globulines contiennent des albumines et les albumines sont souillées par la présence de globulines.

Voulant préciser l'importance des impuretés contenues dans chacune de nos fractions, nous avons étudié le point isoionique des divers mélanges albumines-globulines. Grâce aux résultats obtenus, nous avons pu préciser l'importance de l'hétérogénéité de nos fractions. Nous avons ensuite démontré que les lipides, qui se trouvent fixés aux protéides sous forme de cénapses lipidoprotéidiques, n'avaient pas une influence notable sur le point isoionique des diverses fractions protéidiques que nous avons étudiées.

Tous ces résultats sont parfaitement conformes à ceux obtenus à l'aide de méthodes tout à fait différentes par Mac Farlane, Hewitt et Pérez.

La méthode de fractionnement des protéides sériques utilisant le sulfate d'ammonium ne permet donc pas une séparation convenable des deux grandes fractions protéidiques : les globulines et les albumines.

Faute de mieux, cette méthode reste néanmoins la plus utilisée en clinique, mais « le rapport albumines/globulines ne saurait alors, comme le fait très justement remarquer

Mme ROCHE [155], avoir d'autre signification que celle d'un indice et non la valeur absolue qui lui est en général attribuée ».

Chez l'Homme normal, le rapport albumines/globulines a une valeur comprise entre 1,5 et 1,7. Chez le Cheval, il atteint un chiffre beaucoup moins élevé. Ce rapport présente un grand intérêt clinique, car, au cours de certaines maladies, il est susceptible de subir de profondes modifications.

Vu : *Le Doyen,*
Pour le Doyen :
L'Assesseur,
LABAT.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
CHELLE.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 11 Décembre 1944.
Le Recteur,
Pour le Recteur :
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abderhalden (E.). — Hydrolyse der Kristallisierten serumalbumins aus Pferd. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1902, **37**, 495.
2. Abderhalden (E.) et Komm. — Ueber die Anhydridstruktur des Proteins. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1924, **139**, 181.
3. Achard (C.) et Boutaric (A.). — Quelques recherches physico-chimiques sur les suspensions préparées à partir des protéines séparées du sérum par la méthode dite à l'acétone. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, **195**, 1196.
4. Achard (C.), Boutaric (A.) et Doladilhe (M.). — Sur les propriétés physico-chimiques du sérum sanguin et des protéines séparées de ce sérum par la méthode à l'acétone chez l'homme et chez quelques animaux à l'état normal. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **193**, 271.
5. Achard (C.), Boutaric (A.) et Piettre (M.). — Les protéines du sérum préparées par l'acétone ou par la méthode aux sels. *Bull. Ac. Méd.*, 1933, **109**, 618.
6. Achard (C.), Boutaric (A.) et Roy (M.). — Sur l'activité optique des sérums et des solutions de leurs protéines séparées par la méthode à l'acétone à froid. *C. R. Ac. Sc.*, 1937, **204**, 1288.
7. Achard (C.), Boutaric (A.) et Roy (M.). — Recherches viscosimétriques sur les sérums et les solutions de leurs protéines séparées par la méthode de l'acétone à froid. *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **206**, 395.
8. Adair (G. S.) et Adair (M. E.). — The determination of the isoelectric and isoionic points of haemoglobin from measurements of membrane potentials. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 1230.
9. Adair (G. S.) et Robinson (M. E.). — The analysis of the osmotic pressures of the serum proteins and the molecular weights of albumins and globulins. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 1864.
10. Adair (M. E.) et Taylor (G. L.). — Crystallization of human serum albumin. *Nature*, 1935, **135**, 307.

11. Adnot (A.). — Contribution à l'étude des protides du sérum. Thèse Méd., Strasbourg, 1931.
12. Balint (P.). — Ueber eine neue Art der Fraktionierung des menschlidhen. Serumalbumins. *Klin. Woschr.*, 1943, **22**, 598.
13. Battut (V.-M.). — Recherches expérimentales sur les protéides du sérum sanguin. Thèse doctorat univ. (Pharmacie), Bordeaux, 1939.
14. Bendien (W. M.) et Snapper (I.). — Weitere Untersuchungen über die Bindung der Serumkolloide mittels für Eiweib durchlässiger Ultrafilter. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **261**, 1.
15. Bentégeat (J.). — Le sang dans le rachitisme. Thèse Médecine, Bordeaux, 1940.
16. Bernard (Cl.), *in* Robin (C.) et Verdeil (F.). — Traité de chimie anatomique et physiologique normale et pathologique, 3 vol., Baillière édit., Paris, 1853, p. 299.
17. Biedermann (W.). — Uber Wesen und Bedeutung der Protoplasmalipoïde. *Pflüg. Archiv.*, 1924, **202**, 213.
18. Bierry (H.). — Recherches sur les euglobulines du sérum sanguin. *Trav. des Membres Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1027.
19. Bierry (H.), Gouzon (B.) et Magnan (C.). — Propriété d'une globuline particulière isolée du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 700.
20. Blankenstein (A.) et Fischer (A.). — Untersuchungen über die chemische Konstitution der Serum und Gewebseiweibkörper. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **224**, 211.
21. Boulanger (P.). — Données biochimiques récentes sur la structure des protéines. *In Exposés annuels de Biochimie médicale*, 3e série, Masson édit., Paris, 1942.
22. Boutaric (A.). Quelques récentes recherches sur les protéines (du sérum sanguin). *Rev. gén., scienc.*, 1933, **44**, 359.
23. Boutaric (A.). — Propriétés physicochimiques des protéines du sérum isolées par la méthode à l'acétone. *Protoplasma*, 1933, **18**, 286.
24. Boutaric (A.). — Recherches physicochimiques sur les protéines. *Industrie chimique*, 1935, **22**, 562.
25. Boutaric (A.) et Roy (M.). — Etude physicochimique des protéines. *Acta physico-chim.*, U. R. S. S., 1935, **2**, 51.
26. Boutaric (A.) et Roy (M.). — Etude physicochimique des protéines. *Ann. Physiol. physicochim. biol.*, 1936, **12**, 48.
27. Boutroux (A.). — Influence des lipides sur la séparation des protéines par les sels neutres. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **192**, 854.
28. Brazil (V.). — Mémoire sur la globuline et la sérine. *Congrès de Médecine et Chirurgie, Sâo Paulo*, 1907.
29. Broensted (J. N.). — *Rec. trav. Chim., Pays-Bas*, 1923, **43**, 718.

30. Burk (N. F.). — Osmotic pressure, molecular weight and stability of serum-globulin. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **121**, 373.
31. Burkhardt (A. E.). — Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. *Arch. f. exp. Path.*, 1833, **16**, 322; et *Maly's Jahresb*, 1833, **13**, 113.
32. Butler (A. M.) et Montgomery (H.). — The solubility of the plasma proteins. — I. Dependence on salt and plasma concentrations in concentrated solutions of potassium phosphate. *Journ. of biol. Chem.*, 1932, **99**, 173.
33. Campbell (W. R.) et Hanna (M. I.). — Determination of albumin-globulin ratios in human serum. *Trans. Roy. Soc. Can.*, 1931, **V. 25**, 29.
34. Campbell (W. R.) et Hanna (M. I.). — Sulfites as proteins precipitants. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **119**, 9.
35. Caro (L. de) et Laporta (M.). — Sul variare delia tensione superficiale delle soluzioni proteiche in funzione del pH. *Arch. Soc. Biol.*, 1930, **14**, 1.
36. Chick (H.). — *Biochem. Journ.*, 1914, **8**, 804.
37. Ciaccio — *Boll. Soc. di Biol. sperim.*, 1926, **1**, 114.
38. Cohn (E. J.). — The physical chemistry of the proteins. *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.
39. Damade (R.). — Cours d'anatomie pathologique professé à la Faculté de Médecine de Bordeaux, 1941.
40. Delage (B.). — Le système lipoprotéidique du sérum sanguin. Thèse doctorat ès Sciences, Paris, 1939.
41. Demenier (G.). — Contribution à l'étude des protéines du sérum sanguin. Thèse doctorat univ. (Pharmacie), Bordeaux, 1934.
42. Denis (P.). — Mémoire sur le sang. 1 vol., Baillière édit., Paris, 1859.
43. Derivaux (J.). — Protéines sanguines et rapport A/G chez les Chevaux, les Bovidés et les Chiens normaux. *Acta biol. belg.*, 1942, **2**, 295.
44. Derrien (Y.), Roche (J.) et Mandel. — Sur le fractionnement des constituants protéiques du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 348.
45. Doladilhe (M.). — Sur la dissociation de la globuline en deux constituants, la protéine visqueuse et homoglobuline. *C. R. Soc. biol.*, 1937, **125**, 409.
46. Duboy (J.). — Recherches sur la précipitation des albumines et des lipides du sérum sanguin par le sulfate d'ammonium en fonction du pH. Thèse doctorat univ. (Pharmacie), Bordeaux, 1943.
47. Dulière (W.-L.). — Les albumines et des globulines dans le sérum humain d'après différentes méthodes de précipitation. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 923.

48. Eichwald. — Beiträge zur chem. d. gewebebild. Substanzen. Berlin, 1873.
49. Fischer (A.). — Transformation of serum albumin into serum globulin. *Naturwissenschaften,* 1931, **19,** 965; d'après *Chem. Abstr.,* 1932, **26,** 1630.
50. Florence (G.). — Précis de chimie biologique et médicale. 1 vol., Maloine édit., Paris, 1944.
51. Florkin (M.). — Biochimie générale (1 vol., Masson et Desoer édit., Paris-Liège, 1943) et Biochimie humaine (1 vol., Desoer et Masson édit., Liège-Paris, 1943).
52. Freund (E.) et Joachim (J.). — Zur Kenntniss der Serumglobuline. *Zeitschr. f. physiol. Chem.,* 1902, **36,** 407.
53. Fuld (E.) et Spiro (K.). — Ueber die labende und labhemmende wirkung des Blutes. *Zeitschr. f. physiol. Chem.,* 1900, **31,** 132.
54. Goldschmidt (O.) et Kahn (H.). — Die Fraktionierung der wasserlöslichen Eiweisskörper des Blutserums. *Zeitschr. f. physiol. Chem.,* 1929, **183,** 19.
55. Gorter (E.) et Blokfer (P. C.). — Détermination de l'albumine et de la globuline du sérum par la méthode d'étalement. *Proc. Amsterdam,* 1942, **45,** 151; d'après *Bull. Soc. Chim. de France,* 1943, 56.
56. Grabar (P.). — Préparation de sérum-albumine sèche, pure, cristallisable. *C. R. Soc. Biol.,* 1938, **112,** 1094.
57. Grabar (P.). — Ultrafiltration fractionnée des protéines du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.,* 1934, **116,** 72.
58. Grinstein (M.). — Crystallization of blood albumin of various species. *Anales Asoc. quim. Argentina,* 1936, **24,** 11; d'après *Chem. Abstr.,* 1936, **30,** 8282.
59. Guerber. — Sitzungsbericht d. Wuezburger med. ges., 1894.
60. Guillot (N.) et Leblanc (F.). — Note sur la présence de la caséine et les variations de ses proportions dans le sang de l'homme et des animaux (suite). *C. R. Ac. Sc.,* 1850, **31,** 585.
61. Halliburton. — *Journal of Physiol.,* 1886, **7,** 319.
62. Hammarsten (E.). — *Zeitschr. f. physiol. Chem.,* 1884, **8,** 467.
63. Hammarsten (E.). — Ueber die Eiweisstoffe des Blutserums. *Erg. der Physiol.,* 1903, **1,** 330.
64. Handowsky et Pauli. — *Hofmeister Beiträge,* 1908, **11,** 415.
65. Handowsky et Wagner. — *Biochem. Zeitschr.,* 1911, **31,** 33.
66. Hardy (W. B.). — Colloidal solution. The globulins. *Journ. of Physiol.,* 1905, **33,** 251.
67. Haslam. — *Biochem. Journ.,* 1913, **7,** 492.
68. Hewitt (L. F.). — Chemistry of antibodies and serum proteins. — I. Nitrogen distribution and aminoacids. — II. Protein carbohydrate groups. *Biochem. Journ.,* 1934, **28,** 2080.

69. Hewitt (L. F.). — Separation of serum albumin into two fractions. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 2229.

70. Hewitt (L. F.). — Preparation and properties of a globulin present in the albumin fraction of serum. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 26.

71. Hewitt (L. F.). — Serum proteins in normal and pathological conditions. — I. The blood serum of normal animals. — II. Human blood serum and pathological body fluids. — III. Horse serum studies by means of the precipiting reaction. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 1540.

72. Hofmeister (F.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Dritte Mittheilung. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1889, **25**, 1.

73. Hofmeister (F.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Funfte Mittheilung. Untersuchungen über den Quellungsvorgang. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1889, **27**, 395.

74. Hofmeister (F.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Sechste Mittheilung. Die Betheiligung gelöster Stoffe an quellungsvorgängen. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1890, **28**, 210.

75. Holden (H. F.) et Freeman (M.). — Proteins of ox serum. *Australian Journ. exptl. Biol. Sci.*, 1933, **11**, 185.

76. Homer (A.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1889, 278.

77. Hopkins et Pinkus. — *Journ. of Physiol.*, 1891-1899, **23**, 130.

78. Hoppe-Seyler (F.). — *Handbuch der phys. Chem.*, 1870, **3**, 196.

79. Hongardy. — *Chem. Zentralbl.*, 1900, **2**, 682.

80. Howe. — The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1921, **49**, 93.

81. Jemeson (E.) et Roberts (D. B.). — A phase rule study of the proteins of the blood serum : a comparison of the proteins of human, rat and horse serum. *Journ. gen. Physiol.*, 1937, **20**, 475.

82. Kalcheva (D.). — Precipitation of the protein of blood serum by copper sulfate. *Ann. Univ. Sofia II, Faculté phys. math.*, 1934, **30**, n° 2, 61; d'après *Chem. Abstr.*, 1935, **29**, 3360.

83. Kauder (G.). — Zur Kenntniss der Eiweisskörper des Blutserums. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1886, **20**, 411.

84. Keckwick (R. A.). — Observations on the crystallizable albumin fraction of horse serum. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 552.

85. Keckwick (R. A.). — The electrophoretic analysis of normal human serum. *Biochem. Journ.*, 1939, **33**, 1122.

86. Kendall (F. E.). — Studies on human serum proteins. —

II. Crystallization of human serum albumin. *Journ. of biol. Chem.*, 1941, **138,** 97.

87. Kingsley (G. R.). — The determination of serum total protein, albumin and globulin by the biuret reaction. *Journ. of biol. Chem.*, 1939, **131,** 197.

88. Klobusitzky (D. Von). — Physikalisch chemische Studien über Eiweiss. Alkoholgemische. *Biochem. Zeitschr.*, 1934, **271,** 385.

89. Kuhne. — Lehrb. d. physiol. Chem. Leipzig, 1886, p. 175.

90. Kylin (Eskil). — Isoelectric point of native human serum albumin. *Acta Med. Scand.*, 1936, **87,** 536; d'après *Chem. Abstr.*, 1936, **30,** 3000.

91. Labarbe (M.). — Importance biologique et médicale de l'index lipoalbuminique de Machebœuf et Wahl dans le diagnostic de la néphrose lipoïdique. Thèse Médecine, Bordeaux, 1939.

92. Lambling (E.). — Le sang et la respiration. *In* Encyclopédie chimique, 1 vol., Flammarion édit., Paris, 1895.

93. Lefrou (G.) et Bonnet (P.). — L'équilibre protéique du sérum sanguin des lépreux. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1934, **27,** 35.

94. Lehmann. — Lehrb. d. Physiol. 1862, 428; cité d'après Lambling [92].

95. Lévy (M.), Mignon (S.) et Netter (A.). — Détermination des points isoioniques de l'hémoglobine et des protéines totales du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18,** 1311.

96. Lewith (S.). — Zur Lehre von der Wirking der Salze. *Arch. f. expt. Path.*, 1888, **24,** 1.

97. Luetscher (J. A.). — Serum Albumin. — II. Identification of more than one albumin in Horse and Human Serum by electrophoretic mobility in acid solution. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61,** 2888.

98. Lunde (G.) et Wulfert (K.). — Über die Fällung von Eiweisskörper mit Eisenhydroxydsol. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **219,** 171.

99. Lundin (H.) et Schröderheim (J.). — Über die Fällung von Eiweisstoffen und ihrer Spaltungsprodukte mit Tannin. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **238,** 1.

100. Mac Farlane (A. S.). — The ultracentrifugal analysis of normal and pathological serum fraction. *Biochem. Journ.*, 1935, **29,** 1209.

101. Machebœuf (M.). — Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguins. Thèse doctorat ès Sciences, Paris, 1928.

102. Machebœuf (M.). — Recherches sur les phophoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguins. — I. Entraînement des phosphoaminolipides et des stérides par les

diverses fractions au cours du fractionnement des protéidés du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 268.

103. Machebœuf (M.). — Recherches sur les phosphoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguins. — II. Etude physicochimique de la fraction protéidique la plus riche en phosphoaminolipides et en stérides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 485.

104. Machebœuf (M.). — Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. 1 vol., Hermann édit., Paris, 1937.

105. Machebœuf (M.). — Cours de chimie biologique et médicale. 2 vol., Tournier & Constant édit., Paris, 1940.

106. Machebœuf (M.) et Duboy (J.). — Etude de la précipitation des albumines du sérum sanguin et des lipides qui les accompagnent par le sulfate d'ammonium en fonction du pH. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 272.

107. Machebœuf (M.) et Januskiewicz (M.). — Recherches sur les cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin : Nature des protéides entrant dans la constitution de ces cénapses. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 694.

108. Machebœuf (M.) et Sandor (G.). — Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, **194**, 1102.

109. Machebœuf (M.) et Sandor (G.). — Recherches sur la nature et la stabilité des complexes protéides-lipides. Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 1168; et *Arch. intern. Physiol. et Physicoch. biol.*, 1932; et *Congrès intern. Physiol. Rome*, 1932, 163.

110. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Sur l'état des lipides et du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction de certaines cénapses lipidoprotéidiques et libération de leurs substances lipoïdiques par un savon. *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **206**, 860.

111. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Libération des lipides de certaines cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin par divers savons. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1181.

112. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Méthode permettant de délipider, sans les dénaturer, les globulines du sérum sanguin. Application à l'étude du rôle des lipides dans le fractionnement des globulines en euglobulines et pseudoglobulines. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1184.

113. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Essais sur la nature des albumines du sérum des malades atteints de néphrose lipoïdique. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 478.

114. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Nouvelles recherches sur la nature et la stabilité des liaisons unissant les lipides aux

protéides dans le sérum sanguin. Libération des lipides de certaines cénapses lipidoprotéidiques par divers savons. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 31.

115. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Action des savons et de l'éther sur les cénapses lipidoprotéidiques contenues dans les diverses fractions protéidiques du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 49.

116. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Recherches sur la néphrose lipoïdique. Comparaison physicochimique des albumines de sérums de malades atteints de néphrose lipoïdique et des protéides de sujets normaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 196.

117. Machebœuf (M.), Tayeau (F.) et Battut (V.-M.). — Comparaison des diverses techniques de séparation et de dosage des globulines et de leurs fractions dans le sérum sanguin. Considérations sur la définition des termes « globulines », « euglobulines » et « pseudoglobulines ». *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 481.

118. Mac Meekin (T. L.). — Serum albumin. Préparation et propriété d'une sérum albumine (de Cheval) cristallisée de solubilité constante. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 2884.

119. Malerba. — *Acad. de Scienze fisiche et med. d. Napoli*, fasc. 3, 5, 1894.

120. Marcus (E.). — Ueber in Wasser lösliches Serumglobulin. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1899, **28**, 559.

121. Martin (M.) et Neuzil (E.). — Les variations des constituants sanguins au cours du passage du clinostatisme à l'orthostatisme. *Journ. Méd. Bordeaux*, 1944, sous presse.

122. Metzger. — Recherches sur la constitution des protides du sérum à l'état normal et pathologique. Thèse Médecine, Strasbourg, 1932.

123. Michailow. — *Maly's Jahresb*, 1884, **14**, 7.

124. Miescher (F.). — *Mediz. gem. Untersuch. a. d. Labor. f. Angew. Chem. zu Tübingen*, 1871, **4**, 441.

125. Moleschott. — *Arch. f. physiol. Heilkunds*, nouvelle suite, 1852, **2**, 105.

126. Mutzenbecher (P. Von). — Die Analyse des Serums mit der Ultracentrifuge. Die Fraktionen des Serums. Dissoziationen und Assoziationen der Serummoleküle. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **266**, 226.

127. Mutzenbecher (P. Von). — Die Fraktionen des Serums. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **266**, 250.

128. Mutzenbecher (P. Von) et Svedberg (T.). — Analysis of serum with the ultracentrifuge. *Naturwissenschaften*, 1933, **21**, 331; d'après *Chem. Abstr.*, 1933, **27**, 4823.

129. Neuzil (E.) et Martin (M.). — Les variations humorales de

l'orthostatisme et du clinostatisme. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, sous presse.

130. Ogston (A. G.). — Mixtures of serum albumin and globulin. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 1952.
131. Ohlson (B.) et Rundqvist (O.). — Über die Bedeutung der Plasmalipoide für die Suspensionsstabilität des Blutes. *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **247**, 249.
132. Oppenheimer. — *Vehr. d. Berl. Physiol. ges.*, 1902.
133. Panum. — *Wirchow. Archiv.*, 1851, **3**, 251.
134. Panum. — *Arch. f. path. Anat.*, 1852, **4**, 17.
135. Pasynskii (A.) et Zolotareva (Z.). — The isoionic point of proteins. — I. Isoionic point of egg albumin. *Journ. Phys. Chem.* (U. R. S. S.), 1936, **8**, 1; d'après *Chem. Abstr.*, 1937, **31**, 1276.
136. Pérez (J. J.). — Contribution à l'étude de la solubilité des protéides. Thèse doctorat ès Sciences, Paris, 1939.
137. Pérez (J. J.) et Sandor (G.). — Optimum de solubilité et point isoionique de la pseudoglobuline du sérum de Cheval. *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **206**, 536.
138. Pfluger (E. F.). — Das glucogen und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit (2e édit.). Bonn, 1905.
139. Pick (E. P.). — *Beitr. chem. Physiol. u. Path.*, 1902, **1**, 351.
140. Piettre (M.). — Séparation des protéines du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, 483; voir également *Archivos do Instituto Vital Brazil*, 1922, **1**, 1.
141. Piettre (M.). — Biochimie des protéines. Des protéines humorales du protoplasma par la méthode à l'acétone aux basses températures. 1 vol., Baillière édit., Paris, 1937.
142. Piettre (M.). — Cristallisation et dessiccation de certaines protéines par le froid. *Food Research*, 1938, **3**, 161.
143. Piettre (M.) et Vila (A.). — Séparation des protéines du sérum. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 1466; et *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, 483.
144. Pinkus. — *Journ. of Physiol.*, 1901, **27**, 57.
145. Pirosky (I.) et Modern (F.). — Action des lécithines sur le fractionnement des sérums antitoxiques et transformation de la pseudoglobuline en euglobuline. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 387.
146. Pohl (J.). — Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins in Harn und in serösen Flussigkeiten. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1886, **20**, 246.
147. Polonovski (M.) et Jayle (M. F.). — Peroxydases animales. Leur spécificité et leur rôle biologique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 66; voir également : Jayle (M. F.), Principes, techniques de dosage et étude clinique de l'haptoglobine. *Ann. de Biol. clin.*, 1943, **1**, 2.
148. Polonovski (M.), Boulanger (P.), Cristol (P.), Florence (G.),

Giberton (A.), Machebœuf (M.), Robert (H.), Roche (J.) et Sannie (C.). — Eléments de biochimie médicale. 1 vol., Masson édit., Paris, 1942.

149. Porges et Spiro. — *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1903, **3**, 277.

150. Przylecki (S. J.). — Effect of addition of salts on the isoelectric point of proteins. *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 713.

151. Przylecki (S. J.). — L'état des bicolloïdes dans la matière vivante. *VI^e Congrès de Chimie biologique, Lyon*, 1937, Masson édit., Paris.

152. Quinnan. — *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1904, **5**, 95.

153. Race (J.). — Determination of blood proteins by acid acetone. *Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 1571.

154. Reboul (R.). — Recherches sur les cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin. Thèse doctorat en Médecine, Bordeaux, 1941.

155. Roche (A.). — Microdosage des albumines et des globulines du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1022.

156. Roche (A.) et Bracco (J.). — Contribution à l'étude du poids moléculaire des globulines du sérum sanguin. *C. R. Ac. Sc.*, 1934, **199**, 98.

157. Roche (A.) et Bracco (J.). — Pression osmotique et poids moléculaire des globulines du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 1479.

158. Roche (A.), Dorier (M.) et Marquet (F.). — Le poids moléculaire de la sérum-albumine d'Homme. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 1150.

159. Roche (A.), Dorier (M.) et Samuel (L.). — Précipitation des protéines du sérum humain normal par le sulfate d'ammonium. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1019.

160. Roche (A.) et Marquet (F.). — Sur la pression osmotique et le poids moléculaire de l'albumine du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 898.

161. Roche (A.), Samuel (L.) et Arthaud (R.). — La précipitation des protéines du sérum par le sulfate d'ammonium et la signification des fractions précipitées à des concentrations variées. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1061.

162. Rollet. — Blut und Bluthewegung in Hermann's. *Handb. d. Physiol.*, 1880, **4**, 90.

163. Saias (E). — Contribution à l'étude des associations lipoprotéidiques en couches moléculaires à la surface de solutions aqueuses. Thèse doctorat en Pharmacie, Paris, 1942.

164. Sandford (B. Hooker) et Boyd (W. C.). — The alleged transformation of serumalbumin into serumglobulins. *Journ. of biol. Chem.*, 1933, **100**, 187.

165. Sandor (G.). — Le problème des protéides. Thèse doctorat ès Sciences, Paris, 1934.

166. Sandor (G.). — Le point isoélectrique des protéides. *C. R. Ac. Sc.*, 1935, **200**, 1371.

167. Sandor (G.). — Point isoionique des protéides du sérum. — I. Méthode de détermination. Résultats obtenus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 877.

168. Sandor (G.), Bonnefoi (A.) et Goret (P.). — Précipitation des albumines et des lipides du sérum sanguin par les sels neutres en fonction du pH. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 1472.

169. Sandor (G.), Bonnefoi (A.) et Pérez (J. J.). — Précipitation des protéides par les sels neutres. *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **197**, 1254.

170. Sandor (G.) et Marcus (A.). — Les points isoioniques des protéides du sérum. — II. Effet des sels neutres sur le point isoionique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 555.

171. Schenck (E. G.) et Kunstmann (H. K.). — Ueber die Abhängigkeit des Baues der Proteine des Blutserums von den Stoffwechselvorgängen im Organismus. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1933, **215**, 87.

172. Schmidt (V.). — Weiteres über den Faserstoff und die Ursachen semer Gerunnung. *Arch. f. Anat. u. Physiol.*, 1862, **48**, 428.

173. Schmitz (A.). — Zur Kenntniss der Serumproteine. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **241**, 271.

174. Schmitz (A.). — Über eine Methode zur qualitativen Analyse von Eiweisslösungen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1933, **221**, 197.

175. Seng (W.). — Ueber die qualitativen und quantitativen verhältnisse der Eiweisskörper im Diphtherieheilserum. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*, 1899, **31**, 513.

176. Siegfried (E. M.). — The precipitation of proteins with complex salts. *Biochem. Journ.*, 1939, **33**, 924.

177. Sœrensen (S. P. L.). — Studies on proteins. *C. R. Lab. Carlsberg*, 1915-17, **12**, 1.

178. Sœrensen (S. P. L.). — Proteins. 1 vol., Fleischmann édit., 1925.

179. Sœrensen (M.) et Haugaard (G.). — Über die Anwendbarkeit der Orcinreaktion zur Bestimmung der Art und Menge von Kohlenhydratgruppen in Eiweisstoffen. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **260**, 247.

180. Sœrensen (S. P. L.), Linderström-Long (K.) et Lund. — *Journ. gen. Physiol.*, 1925-27, **8**, 543.

181. Starke (K. V.). — *Maly's Jahresb*, 1881, **11**, 17.

182. Svedberg (P.) et Sjœgren (B.). — The molecular weight of serum albumin and of serum globulin. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 3318.

183. Svedberg (P.) et Tisselius (A.). — *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1926, **48,** 2272.

184. Svensson (H.). — Fractionation of serum with ammonium sulfate and water dialysis, studies by electrophoresis. *Journ. of biol. Chem.*, 1941, **139,** 805.

185. Tayeau (F.). — Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides et les protéides dans le sérum sanguin. Thèse doctorat ès Sciences, Bordeaux, 1939.

186. Tayeau (F.). — Comparaison de l'action des divers savons sur le sérum sanguin en présence d'éther. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130,** 1027.

187. Tayeau (F.). — Recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des lipides sériques en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130,** 1029.

188. Tayeau (F.). — Sur l'état du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction des cénapses cholestéroprotéidiques par les saponosides. *C. R. Ac. Sc.*, 1941, **212,** 575.

189. Tayeau (F.). — Destruction des cénapses cholestéroprotéidiques du sérum sanguin par les sels biliaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137,** 240.

190. Tayeau (F.). — Nouvelles recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des cénapses cholestéroprotéidiques, en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, sous presse.

191. Tayeau (F.). — Protéides et lipides dans le sérum sanguin. Thèse doctorat en Médecine, Bordeaux, 1944.

192. Tayeau (F.). — Nouvelles recherches sur la nature et la stabilité des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26,** sous presse.

193. Tayeau (F.). — Etude sur les euglobulines du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26,** sous presse.

194. Tayeau (F.). — Sur la nature des liaisons unissant les divers lipides aux protéides dans les cénapses acidoprécipitables du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, sous presse.

195. Tayeau (F.) et Martin (M.). — Sur la séparation des diverses fractions protéidiques du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137,** 503.

196. Tayeau (F.) et Martin (M.). — Sur la séparation des globulines et des albumines sériques à l'aide du sulfate d'ammonium. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, sous presse.

197. Taylor (H.) et Keys (A.). — Poids moléculaires moyens des mélanges artificiels d'albumine et de globuline de plasma de bœuf. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1940, **44,** 557.

198. Tebb (C.). — The precipitation of proteids by alcohol and certain other reagents. *Journ. of Physiol.*, 1905, **30,** 25.

199. Theorell (A. H.) et Widström (G.). — Method for determination of fibrin, globulin and albumin in blood plasma. *Zeitschr. ges. exptl. Med.*, 1931, **75**, 692; d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 2206.

200. Thiodet (J.) et Ribère (M.). — Nécessité d'une « normalisation » des définitions et des méthodes pour le dosage des protéines du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 495.

201. Thomas (P.). — Manuel de biochimie. 1 vol., Masson édit., Paris, 1936.

202. Tiselius (A.). — Electrophoresis of serum globulin. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 313.

203. Tiselius (A.). — Electrophoresis of serum globulin. — II. Electrophoretic analysis of normal and immune serum. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 1464.

204. Went (I. S.) et Farago (F.). — Der Einflud des Lecithins auf die Stabilität der Serum-Eiweisskörper. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **230**, 238.

205. Went (I. S.) et Goreczky (L.). — Die Verteilung der Serumphosphatide und des Cholesterins in durch Filtration durch grobporige Kolloidiumfilter gewonnenen Serumultrafiltraten. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **239**, 441.

206. Weyl (T.). — Beiträge zur Kenntniss thierischer und pflanzlicher Eiweisskörper. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1877, **1**, 72.

207. Wierner (H.). — Über quantitative globulinbestimmungen mittels Ammoniumsulfatfällung und über die Reindarstellung von Globulinen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1911, **74**, 29.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 11

PREMIÈRE PARTIE

Etude historique

CHAPITRE PREMIER. — RAPPEL DES NOTIONS ÉLÉMENTAIRES SUR LES PROTÉIDES 13

I. — Poids moléculaire des protéides 14
II. — Pouvoir amphotère des protéides 15
III. — Constitution des protéides 16

CHAPITRE II. — LES PROTÉIDES DU SÉRUM SANGUIN. EXPOSÉ DES DIVERSES TECHNIQUES DE SÉPARATION 18

I. — Fractionnement des globulines 23
II. — Fractionnement des albumines 26
III. — Différenciations entre globulines et albumines ... 28

DEUXIÈME PARTIE

Principales techniques utilisées

I. — Point isoionique des protéides 31
II. — Séparation des globulines et des albumines du sérum 34
III. — Dosage des protéides 35
IV. — Dosage du cholestérol 35
V. — Préparation des globulines purifiées 35
VI. — Préparation des albumines cristallisées 35
VII. — Délipidation des protéides sans dénaturation 36

TROISIÈME PARTIE

Recherches expérimentales

CHAPITRE PREMIER. — LA PRÉCIPITATION DES PROTÉIDES SÉRIQUES PAR LE SULFATE D'AMMONIUM 39

I. — Essais sur le sérum de Cheval 40

Pages

II. — Essais sur le sérum d'Homme 47
Interprétation et discussion 48
Conclusions du chapitre premier 52

Chapitre II. — La solubilité dans les solutions salines constitue-t-elle un caractère suffisant pour définir les globulines et les albumines ? 54

I. — Essais sur le sérum de Cheval 55
II. — Essais sur le sérum d'Homme 59
Interprétation 62
Conclusions du chapitre II 63

Chapitre III. — Point isoionique des mélanges de globulines et d'albumines 65
Conclusions du chapitre III 69

Chapitre IV. — Rôle des lipides dans la précipitation des fractions protéidiques du sérum par le sulfate d'ammonium 71
Conclusions du chapitre IV 73

Chapitre V. — Quelques résultats pratiques 74
Conclusions du chapitre V 77

Conclusions générales 79

Bibliographie 83

Bordeaux. — Imp. E. Drouillard, 3, place de la Victoire. — N° 31.2174